

# **„Die GABAerge Innervation des Ganglion ciliare bei verschiedenen Wirbeltierspezies“**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Vorgelegt von Miriam Barnerßoi aus Landshut



Diese Dissertation wurde angefertigt  
unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler  
im Bereich des Lehrstuhl I der Anatomischen Anstalt  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Hans Straka

Tag der Abgabe: 09.05.2019

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2019



„ If your eyes are open you will see the things worth seeing“

*Rumi*



## ABSTRACT

The vertebrate ciliary ganglion (CG) is a relay station in the parasympathetic pathway activating the iris sphincter and ciliary muscle to mediate pupillary constriction and lens accommodation, respectively. While the postganglionic motoneurons in the CG are cholinergic, as are their inputs, there is evidence from avian studies that the inhibitory neurotransmitter gamma aminobutyric acid (GABA) may also be involved.

In the first part of this thesis the GABAergic innervation was therefore examined and characterized more closely by using light and electron microscopic methods on the CG of Macaque monkeys. Immunohistochemistry for the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD) and choline acetyltransferase (ChAT) revealed that all CG neurons are contacted by ChAT-positive terminals. A subpopulation of 17.5% of CG neurons was associated with terminal boutons expressing GAD-immunoreactivity in addition. Double-labeling for GAD and synaptophysin (Syn) confirmed that these were synaptic terminals. Electron microscopic analysis in conjunction with GABA-immunogold staining showed that (1) GAD-positive terminals mainly target dendrites and spines in the perisomatic neuropil of CG neurons; (2) GABA is restricted to a specific terminal type, which displays intermediate features of classically excitatory and inhibitory endings; and (3) if a CG neuron is contacted by GABA-positive terminals, virtually all perisomatic terminals supplying it show GABA immunoreactivity. Immunohistochemical stainings for GABA-receptors revealed that in all CG-neurons GABA-A, as well as GABA-B1 receptors are expressed, not only in GAD-recipient neurons indicating that the GABAergic input to the CG is functional.

The second part of this thesis concentrates on the question regarding the function of this GABAergic input to CG-neurons. As there are two different functional subpopulations of neurons in the CG - neurons that mediate pupillary constriction and neurons that mediate lens accommodation - various „projects“ were designed and executed to discover if GABA contributes to a specific CG function.

Tract-tracer injections into the anterior or posterior eye chamber of rats and the ciliary muscle of a Macaque monkey were carried out using Wheat germ agglutinin (WGA) or Cholera toxin subunit B (CTB). Subsequent immunohistochemistry

for the respective tracer and GAD revealed that tracer-positive, as well as tracer-negative neurons were contacted by GAD-positive terminals in all cases suggesting that not a single subpopulation of CG-neurons is targeted.

Albinos are known to have reduced accommodative function. CG of pigmented and albino rats were examined for the strength of their GABAergic input. Immunohistochemical stainings for ChAT and GAD showed that in the CG of albino rats less neurons received a GABAergic input (~ 13.0%) than in pigmented wildtypes (~ 60.0%).

Unlike in other vertebrates the CG of birds contains three functionally different neuron subpopulations: ciliary neurons that target the iris sphincter or ciliary muscle and are contacted by one single cap-like ending and choroidal neurons that project to the choroid regulating blood flow in the eye and are contacted by many bouton-like endings. A wholemount preparation of a pigeon-CG immunofluorescence-stained for GAD revealed cap-like as well as bouton-like endings that were GAD-positive. This finding indicates that GABA is involved in pathways mediating choroideal blood flow in addition to pupil constriction and lens accommodation.

The CG of different vertebrate species with different visual capabilities and eye position were examined for their GABAergic input. The quantitative analysis did not show any correlation between strength of GABAergic input and visual abilities. The fact that the CG-neurons of all examined species receive a GABAergic input, suggests that the GABAergic input to CG-neurons is a common feature in vertebrates.

In the last part of this thesis I concentrated on the localization of the possible source of the GABAergic input to the CG by using anterograde tract-tracing techniques in Macaque monkeys and immunohistochemical methods in conjunction with NeuroLucida. As the preganglionic Edinger-Westphal nucleus (EWpg) located in the supraoculomotor area (SOA) is the source of cholinergic, postganglionic terminals in the CG the idea was to take a closer look at this area at first. Anterograde tracer-injections with biotinylated dextran amine (BDA) or CTB into the SOA (2 Macaque monkeys) or into brain regions in the vicinity of but not into the oculomotor nucleus (nIII)-complex (2 Macaque monkeys, controls) resulted in tracer-labeled terminals in the CG for injections into the SOA. Injections outside of the nIII-



complex did not result in tracer-labeled endings in the CG. Double-immunofluorescence stainings for the respective tracer and GAD revealed numerous double-labeled terminals in the CG for one case where the tracer-injection was placed into the lateral SOA, suggesting this area to contain the preganglionic neurons of GAD-positive endings in the CG. In addition, neighbouring monkey brain sections were stained for ChAT and GAD and subsequently analysed with Neurolucida. The analysis did not show any double-labelled neurons in the area of the SOA, but both ChAT- and GAD-positive neurons were strongly intermingled.

Further investigations are necessary to answer the still open questions regarding the GABAergic innervation of the CG. Nevertheless, the present data indicate that the source of the GABAergic input to the CG is located in the supraoculomotor area in the mesencephalon. The study shows that the innervation of the CG is more complex than previously thought, and that GABA may play a neuromodulatory role in the control of lens **and** pupil function.

---

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Ganglion ciliare (CG) von Wirbeltieren ist eine Station im parasympathischen Signalweg, durch welchen mittels Ansteuerung des M. sphincter pupillae und des M. ciliaris Pupillenkonstriktion beziehungsweise Nah-Akkommodation vermittelt werden. Während die postganglionären Motoneurone im CG, ebenso wie ihre Eingänge, cholinerg sind, gibt es Hinweise von Arbeiten, durchgeführt an Vögeln, dass der inhibitorische Neurotransmitter Gamma-aminobuttersäure (GABA) ebenfalls in diese Signalwege involviert sein könnte.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde dieser GABAerge Eingang daher mittels licht- und elektronenmikroskopischer Methoden, angewendet im CG eines Makaken, untersucht und näher charakterisiert. Immunhistochemische Färbungen auf das GABA-synthetisierende Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD) und Cholinacetyltransferase (ChAT) zeigten, dass alle CG-Neurone von ChAT-positiven Terminalen kontaktiert werden. Eine Subpopulation von 17,5% der CG-Neurone war zusätzlich mit GAD-immunreaktiven Endknöpfchen assoziiert. Doppelmarkierungen auf GAD und Synaptophysin (Syn) bestätigte, dass diese Knöpfchen synaptische Terminalen repräsentieren. Die elektronenmikroskopische Analyse in Verbindung mit einer GABA-Immunogold Markierung zeigte, dass (1) GAD-positive Terminalen hauptsächlich Dendriten und „spines“ im perisomatischen Neuropil von CG-Neuronen kontaktieren; (2) GABA auf einen spezifischen Terminaltyp beschränkt ist, der Merkmale besitzt, die zwischen klassisch exzitatorisch und inhibitorisch anzusiedeln sind; und (3) wenn ein CG-Neuron von GABA-positiven Terminalen kontaktiert wird, virtuell alle perisomatischen Terminalen, die dieses Neuron umgeben, GABA-Immunreaktivität zeigen. Immunhistochemische Färbungen auf GABA-Rezeptoren zeigten, dass alle CG-Neurone sowohl GABA-A, als auch GABA-B1 Rezeptoren exprimieren und zwar nicht nur diejenigen Neurone, die einen GABAergen Eingang in Form von GAD-positiven Endigungen erhalten, sondern alle. Dies deutet darauf hin, dass der GABAergen Innervation eine funktionelle Bedeutung zukommt.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach der Funktion dieses GABAergen Einganges auf CG-Neurone. Da es im CG zwei funktional unterschiedliche Neuronensubpopulationen gibt – Neurone, die Pupillenkonstriktion

vermitteln und Neurone, die Nah-Akkommodation steuern – wurden verschiedene kleine „Projekte“ durchgeführt, um herauszufinden, ob GABA im CG eine spezifische Funktion zukommt.

Dafür wurden retrograde Trakt-Tracer Injektionen mit Weizenkeimagglutinin (WGA) oder der nicht toxischen Untereinheit B von Choleratoxin (CTB) in die vordere und hintere Augenkammer bei Ratten, sowie eine Injektion in den M. ciliaris eines Rhesusaffen durchgeführt. Anschließend immunhistochemische Färbungen auf den jeweiligen Tracer und GAD zeigten, dass in allen Fällen sowohl Tracer-positive, als auch -negative Neurone von GAD-positiven Terminalen kontaktiert wurden. Das ist ein Hinweis darauf, dass nicht nur eine der beiden funktionellen Subpopulationen im CG kontaktiert wird.

Es ist bekannt, dass Albinos eine reduzierte Akkommodationsfähigkeit besitzen. Die CG von pigmentierten und Albino-Ratten wurden hinsichtlich der Stärke des GABAergen Eingangs untersucht. Immunhistochemische Färbungen auf ChAT und GAD zeigten, dass im CG der Albino-Ratten weniger Neurone einen GABAergen Eingang erhielten (~ 13,0%), als im CG der pigmentierten Wildtypen (~ 60,0%).

Im Vergleich zu anderen Vertebraten enthält das CG von Vögeln drei funktional unterschiedliche Neuronen-Subgruppen: Ciliarneurone, die entweder den M. sphincter pupillae oder den M. ciliaris ansteuern und von einer einzigen Kappen-ähnlichen Endigung kontaktiert werden und Choroidneurone, die zur Choroidea projizieren und den Blutfluss im Auge steuern und von mehreren Knöpfchen-ähnlichen Terminalen kontaktiert werden. Ein „Wholemound“-Präparat eines Tauben-CG, Immunfluoreszenz-markiert auf GAD, zeigte sowohl Kappen-ähnliche, als auch Knöpfchen-ähnliche Endigungen, die GAD-positiv waren. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass GABA zusätzlich zu der Vermittlung von Pupillenkonstriktion und Nah-Akkommodation an der Steuerung des Blutflusses in der Aderhaut beteiligt ist.

Die CG von verschiedenen Wirbeltierspezies mit unterschiedlichen visuellen Fähigkeiten und Augenposition wurden auf ihren GABAergen Eingang hin untersucht, mit der Hoffnung eine Korrelation zwischen der Menge des GABAergen Eingangs und der jeweiligen visuellen Fähigkeiten herstellen zu können. Die quantitative Analyse zeigte keine Korrelation, obwohl einige CG-Neurone von jeder

untersuchten Spezies einen GABAergen Eingang erhielten. Dies deutet darauf hin, dass der Eingang im CG eine allgemeine Eigenschaft von Vertebraten darstellt.

Der letzte Teil dieser Arbeit konzentriert sich auf die Lokalisation der möglichen Quelle der GABAergen Eingänge im CG unter der Verwendung von anterograden Trakt-Tracing Techniken im Rhesusaffen und immunhistochemischen Methoden in Verbindung mit Neurolucida. Da der präganglionäre Edinger-Westphal Kern (EWpg), der im supraoculomotorischen Areal (SOA) lokalisiert ist, die Quelle der cholinergen, postganglionären Terminalen im CG ist, war die Idee dieses Areal als erstes genauer zu untersuchen. Anterograde Tracer-Injektionen mit biotinyliertem Dextran-Amin (BDA) oder CTB in das SOA (2 Rhesusaffen) oder Hirnareale in der Umgebung des, jedoch nicht im Okulomotoriuskern (nIII)-Komplex (2 Rhesusaffen, Kontrollen) resultierten in Tracer-markierten Terminalen im CG bei Tracerinjektion in das SOA. Injektionen außerhalb des nIII-Komplexes resultierten nicht in Tracer-markierten Terminalen im CG. Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen auf den jeweiligen Tracer und GAD zeigten zahlreiche doppeltmarkierte Endigungen im CG für einen Fall, bei dem die Tracer-Injektion in das laterale SOA plaziert wurde. Das lässt vermuten, dass dieses Areal die präganglionären Neurone der GAD-positiven Endigungen im CG enthält. Zusätzlich wurden benachbarte Hirnschnitte eines Affen immunhistochemisch auf ChAT und GAD gefärbt und im Anschluss mit Neurolucida analysiert. Die Analyse zeigte zwar keine doppeltmarkierten Neurone im Bereich des SOA, jedoch waren ChAT- und GAD-positive Neurone stark vermischt.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die noch offenen Fragen die GABAerge Innervation des CG betreffend, zu beantworten. Nichtsdestotrotz deuten die hier gezeigten Daten darauf hin, dass die Quelle des GABAergen Einganges im CG im Mesencephalon in der SOA lokalisiert ist, dass die Innervation des Ganglion ciliare komplexer ist, als bis dato angenommen und, dass GABA eine mögliche neuromodulatorische Rolle bei der Kontrolle von Linsen- **und** Pupillenfunktion inne hat.



# INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT .....	III
ZUSAMMENFASSUNG .....	VII
INHALTSVERZEICHNIS .....	XI
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 DAS GANGLION CILIARE .....	1
1.1.1 Lage und Struktur des Ganglion ciliare .....	2
1.1.2 Funktion des Ganglion ciliare .....	3
1.1.2.1 Pupillenantwort .....	7
1.1.2.2 Nah-Akkommodation .....	11
1.2 PRÄGANGLIONÄRE PARASYMPATHISCHE NEURONE – DER EDINGER- WESTPHAL KERN .....	13
1.3 POSTGANGLIONÄRE PARASYMPATHISCHE CG-NEURONE – FUNKTIONELLE SUBPOPULATIONEN IM CG .....	16
1.4 VERBINDUNGEN DES GANGLION CILIARE .....	18
1.5 WEITERE MÖGLICHE EINGÄNGE AUF DAS GANGLION CILIARE .....	20
1.6 VISUELLE FÄHIGKEITEN UND AUGENPOSITION VERSCHIEDENER SPEZIES .....	21
1.7 ZIELSETZUNG .....	25
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
2.1 VERWENDETES GEWEBE .....	29
2.2 METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DER GABAERGEN EINGÄNGE AUF EINE SUBPOPULATION POSTGANGLIONÄRER CG-NEURONE, SOWIE CHARAKTERISIERUNG DER GABAERGEN INNERVATION DES GANGLION CILIARE BEIM RHESUSAFFEN .....	31
2.2.1 Gewebeaufbereitung für Lichtmikroskopie .....	32
2.2.2 Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf GAD und Synaptophysin (Syn) oder GAD und ChAT .....	34
2.2.3 Gewebeaufbereitung für Elektronenmikroskopie .....	35
2.2.4 „Postembedding“ Immunhistochemie auf GABA mit Immunogold .....	36
2.2.5 Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf GAD und GABA-A Rezeptor oder GABA-B Rezeptor 1 .....	36
2.3 METHODEN ZUR BETEILIGUNG DES GABAERGEN INPUTS IM CG AN DER PUPILLENKONSTRIKTION ODER DER NAH-AKKOMMODATION – FUNKTION .....	38
2.3.1 Identifizierung funktionell unterschiedlicher, postganglionärer Neurone im CG ...	38
2.3.2 Projekt „Albino vs. Wildtyp“ – Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf ChAT und GAD .....	42
2.3.3 Projekt Taube „Wholemout“ .....	42
2.3.4 Projekt „Vergleich der GABAergen Innervation bei verschiedenen Spezies“ .....	43

2.4	METHODEN ZUR LOKALISATION DER QUELLE DER GABAERGEN TERMINALEN IM CG BEIM RHESUSAFFEN.....	45
2.4.1	Anterogrades Tract-Tracing .....	45
2.4.2	Nachweis der doppelt-markierten Endigungen – Immunfluoreszenzfärbung auf BDA bzw. CTB und GAD .....	46
2.4.3	Immunperoxidase-Färbung auf GAD und ChAT.....	47
2.5	TABELLE DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER.....	49
2.6	ANALYSE & DOKUMENTATION .....	50
3	ERGEBNISSE .....	52
3.1	CHARAKTERISIERUNG UND FUNKTIONALITÄT DER GABAERGEN EINGÄNGE AUF EINE SUBPOPULATION POSTGANGLIONÄRER CG-NEURONE .....	52
3.1.1	GAD-positive Knöpfchen entsprechen Terminalen.....	52
3.1.2	ChAT und GAD sind in den CG-Terminalen co-lokalisiert .....	53
3.1.3	Ultrastrukturelle Analyse der Terminalen im CG .....	55
3.1.4	GABA-positive Terminalen entsprechen dem At <sub>2</sub> -Typ.....	57
3.1.5	GABA-A und GABA-B 1 Rezeptoren werden in allen Affen CG-Neuronen exprimiert .....	63
3.2	FUNKTION VON GABA IM GANGLION CILIARE .....	66
3.2.1	Identifizierung funktionell unterschiedlicher, postganglionärer Neurone im CG ...	66
3.2.1.1	Identifizierung von Pupillenneuronen - Tracerinjektion in die vordere Augenkammer bei der Ratte .....	66
3.2.1.2	Identifizierung von Akkommodationsneuronen - Tracerinjektion in die hintere Augenkammer bei der Ratte .....	68
3.2.1.3	Identifizierung von Akkommodationsneuronen - Tracerinjektion in den M. ciliaris beim Makaken.....	70
3.2.2	„Wildtyp vs. Albino“ .....	72
3.2.3	Bei der Taube erhalten Ciliar- und Choroidneurone GABAerge Eingänge .....	75
3.2.4	GABAerger Input auf CG-Neurone bei verschiedenen Spezies .....	77
3.3	LOKALISATION DER QUELLE DER GABAERGEN ENDIGUNGEN IM CG BEIM RHESUSAFFEN .....	81
3.3.1	Anterograde Tract-Tracer Injektionen in das supraoculomotorische Areal (SOA).....	81
3.3.2	Präganglionäre GABA/Cholinerge Neuronenpopulation im Mittelhirn.....	88
4	DISKUSSION .....	91
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER GABAERGEN EINGÄNGE.....	91
4.1.1	Nervenendigungen im CG .....	92
4.1.2	Co-Transmission von ACh/GABA im CG .....	95
4.2	MÖGLICHE QUELLE DES GABAERGEN EINGANGS IM CG – PRÄGANGLIONÄRE NEURONE.....	97
4.3	FUNKTION VON GABA IM CG .....	102
4.4	FAZIT .....	105
	LITERATUR.....	107
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	119



ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	121
TABELLENVERZEICHNIS .....	123
ANHANG .....	123

---

# 1 EINLEITUNG

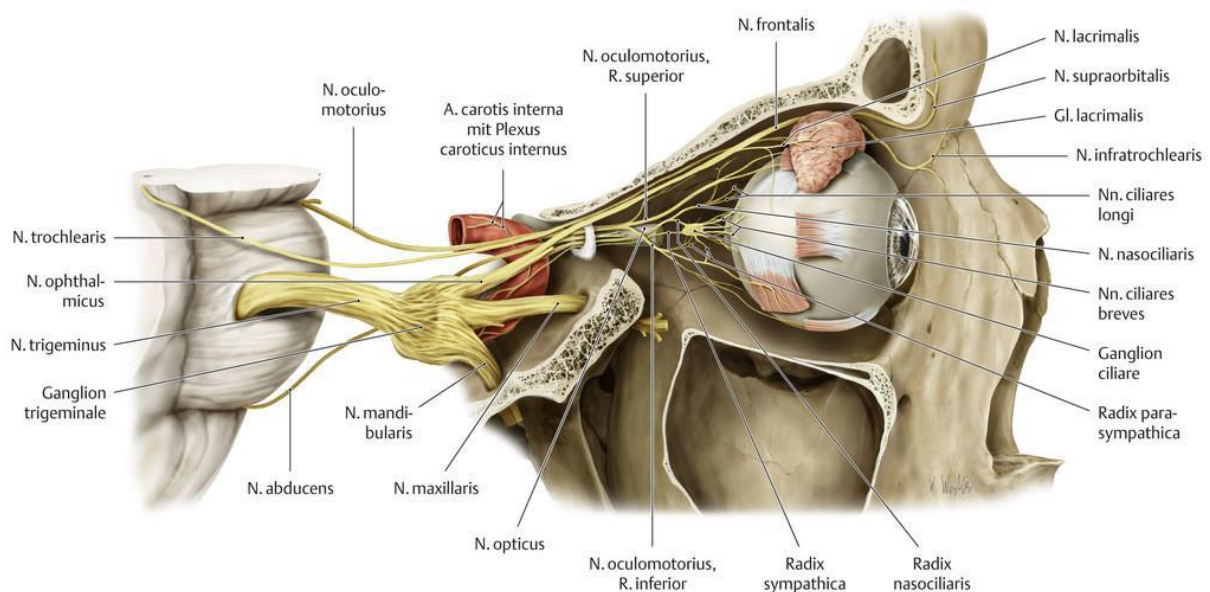
Für viele Lebewesen, insbesondere Vertebraten, ist das Auge wohl eines der wichtigsten Sinnesorgane. Es funktioniert ähnlich einer Kamera. Durch Hornhaut, vordere Augenkammer, Pupille, Linse und Glaskörper wird von der Außenwelt reflektiertes Licht zur Netzhaut geleitet, um die gesammelte Lichtinformation an das Gehirn weiterzuleiten, wo diese verarbeitet wird. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Pupille, sowie der Linse zu. Die Pupille ist dafür zuständig, dass das Auge immer perfekt an den Träger (Spezies) und die gegebenen Lichtverhältnisse der Umwelt angepasst ist, indem durch ihre Eng- oder Weitstellung weniger bzw. mehr Licht auf die Netzhaut (Retina) fällt. Die Linse ihrerseits sorgt für den richtigen Focus, nämlich dafür, dass durch ihre unterschiedliche Krümmung, je nachdem in welcher Entfernung sich ein betrachtetes Objekt befindet, dieses scharf abgebildet wird (Akkommodation). Die Pupillenengstellung (Miosis), sowie die Nah-Akkommodation (Bewegung eines Objektes aus der Ferne in die Nähe) werden durch Neuronenkreise, deren gemeinsames letztes Neuron im Ganglion ciliare (CG) liegt, vermittelt. Diese Vermittlung erfolgt klassischerweise über den erregenden Neurotransmitter Acetylcholin (McDougal and Gamlin, 2015). Beim Huhn gibt es jedoch Daten, die auf eine zusätzliche GABA-Transmission im CG hindeuten (McEachern et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit soll daher zum einen die Bedeutung dieses GABAergen Inputs in das CG geklärt und zum anderen das Vorkommen bei mehreren Wirbeltierspezies untersucht werden.

## 1.1 DAS GANGLION CILIARE

Ein Ganglion ist definiert als eine Anhäufung von Nervenzellkörpern außerhalb des Zentralnervensystems. Weil es bei der Präparation als knotenartige Verdickung auffällt, wird es auch oft als „Nervenknoten“ bezeichnet.

### 1.1.1 Lage und Struktur des Ganglion ciliare

Das Ganglion ciliare (CG) ist eines der vier parasympathischen Ganglien des Kopfes, neben dem Ganglion oticum, dem Ganglion pterygopalatinum und dem Ganglion submandibulare. Es liegt als kleine Ansammlung von Nervenzellen eingebettet in lockeres Bindegewebe im hinteren Drittel der Orbita, zwischen einem der sechs extraokulären Muskeln, die das Auge bewegen, dem M. rectus lateralis (LR) und dem zweiten Hirnnerv, dem N. opticus (NII) (Abb. 1) (Siessere et al., 2008).



**Abbildung 1. Innervation der Orbita.**

Rechte Orbita, Ansicht von lateral nach Entfernung der temporalen knöchernen Wand und des M. rectus lateralis zur Demonstration der Anatomie und Innervation des rechten Auges, sowie der Lage des Ganglion ciliare (Mensch).

Mit freundlicher Genehmigung von Georg Thieme Verlag: Nachdruck aus PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie. Schünke, Michael et al., 2018. Abb. 5.75 E. Copyright © 2018, Rights Managed by Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York.

Die Größe des Ganglions variiert von Spezies zu Spezies. So reicht die Größe des CG von etwa 0,2mm bei der Ratte (Kuder et al., 2003), über ca. 1-2mm beim Vogel (Lenhossek, 1910), über ca. 2mm bei Katze (Zhang et al., 1993) und Rhesusaffe (Zhang et al., 1994a), bis hin zu knapp 3mm beim Menschen (McDougal and Gamlin, 2015).

Ebenso wie die Größe variiert auch die Anzahl der im CG liegenden Neurone von Spezies zu Spezies und sogar zum Teil innerhalb einer Spezies von Individuum zu Individuum. Generell scheint die Anzahl der CG Neurone stark mit der Körpergröße des untersuchten Lebewesens zu korrelieren (Zhang et al., 1993).

Das kleine CG der Ratte besteht beispielsweise aus insgesamt ca. 125 Neuronen (Landis et al., 1987; Maus: ca. 80 – 100; Jackson, 1986), während beim CG von Vögeln schon von ca. 1500 Neuronen (Tauben: Reiner et al., 1991) bis hin zu ca. 3000 Neuronen (Huhn: Landmesser and Pilar, 1974) die Rede ist. Das CG der Katze beinhaltet in etwa 4500 Neurone (Zhang et al., 1993) und das CG von Rhesusaffe und Mensch ca. 3000 Neurone (Affe: Zhang et al., 1994a; Mensch: zwischen 1000 und 7000 Neurone, Perez und Keyeser, 1986).

Die Somata der CG Neurone sind alle von sogenannten Satellitenzellen umgeben (May and Warren, 1993). Diese Satellitenzellen kontrollieren das Mikromilieu innerhalb des CG und sind an der Regulation der synaptischen Transmission beteiligt (Watanabe, 1972; Hanani, 2010; Perea and Araque, 2010).

### 1.1.2 Funktion des Ganglion ciliare

Das Ganglion ciliare enthält parasymphatische, postganglionäre, cholinerge Neurone (Martin and Pilar, 1963b; Landmesser and Pilar, 1972) deren Axone als Nervi ciliares breves (NCB) zu zwei inneren Augenmuskeln, dem M. sphincter pupillae und dem M. ciliaris, nicht jedoch zum M. dilatator pupillae, ziehen. Letzterer ist sympathisch über das Ganglion cervicale superius (SCG) innerviert. Damit vermittelt das CG beim Pupillenreflex die Verengung der Pupille (Miosis), die parasymphatisch über den M. sphincter pupillae gesteuert wird und die Nah-Akkommodation, die ebenfalls parasymphatisch mittels des M. ciliaris dirigiert wird (Abb. 2) (Martin and Pilar, 1963a; Burde, 1967; Marwitt et al., 1971; Hultborn et al., 1978; Reiner et al., 1983; Neuhuber and Schrödl, 2011).

Das CG ist nicht an der sympathisch gesteuerten Pupillenerweiterung (Mydriasis), welche über den M. dilatator pupillae gesteuert wird, beteiligt.

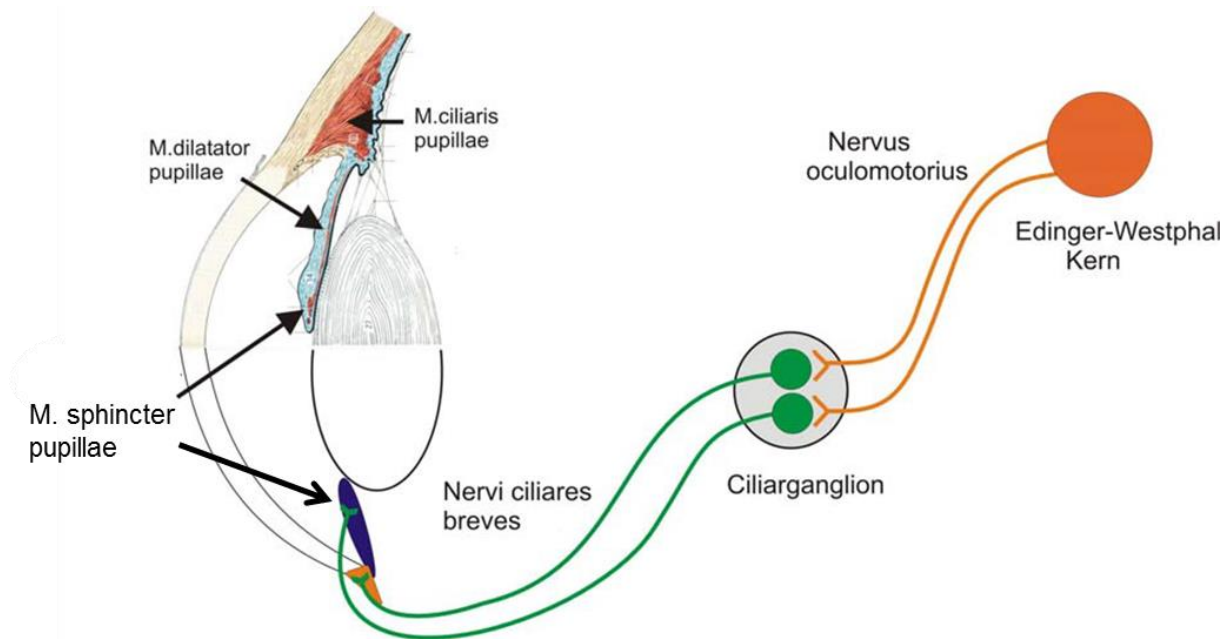


Abbildung 2. Die innere Augenmuskulatur dargestellt am menschlichen Auge und ihre Verbindung über das Ganglion ciliare (CG) zum Edinger-Westphal Kern (EW). Mit freundlicher Genehmigung von Georg Thieme Verlag: Nachdruck modifiziert aus PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie. Schünke, Michael et al., 2018. Abb. 5.48 A. Copyright © 2018, Rights Managed by Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York.

### Innere Augenmuskeln

Zu den inneren Augenmuskeln werden drei Muskeln gezählt: Der M. sphincter pupillae, der M. dilatator pupillae und der M. ciliaris. Sie bestehen bei allen Säugetieren aus glatter, vegetativ gesteuerter Muskulatur. Nur bei Vögeln und Reptilien bestehen sie aus quergestreifter Muskulatur (Reger, 1966).

Die Pupille ist dafür zuständig die Lichtmenge, die auf die Retina fällt, zu regulieren.

Bei der Konstriktion der Pupille, auch Miosis genannt, wird bei hellen Lichtverhältnissen durch die Kontraktion des **M. sphincter pupillae**, dafür gesorgt, dass die Pupille kleiner wird und dadurch weniger Licht auf die Retina fällt. Der M. sphincter pupillae ist ein Ringmuskel innerhalb der Iris des Auges, welche die vordere gegen die hintere Augenkammer abgrenzt (Abb. 3). Er wird über die NCB

von den parasympathischen, postganglionären CG-Neuronen innerviert (McDougal and Gamlin, 2015).

Der **M. dilatator pupillae** ist der Gegenspieler oder Antagonist des M. sphincter pupillae und dient somit der Pupillenerweiterung (Mydriasis). Dieser Muskel wird über postganglionäre, sympathische Fasern aus dem SCG, die die Arteria carotis interna als Plexus caroticus internus begleiten und als sympathische Wurzel in das CG eintreten, innerviert. Nachdem die Axone das CG ohne Umschaltung wieder verlassen haben, verlaufen die Axone der sympathischen Neurone als Nervi ciliares longi Richtung Auge. Neben dem M. dilatator pupillae werden auch die Blutgefäße der Aderhaut (Choroidea) vom SCG innerviert.

Einige der postganglionären, sympathischen Fasern ziehen am CG vorbei und verlaufen zusammen mit den Nervi ciliares longi aus dem N. nasociliaris, einem Unterast des ophthalmischen Astes des N. trigeminus (NV<sub>1</sub>), zum Auge (Kandel et al., 2013; McDougal and Gamlin, 2015).

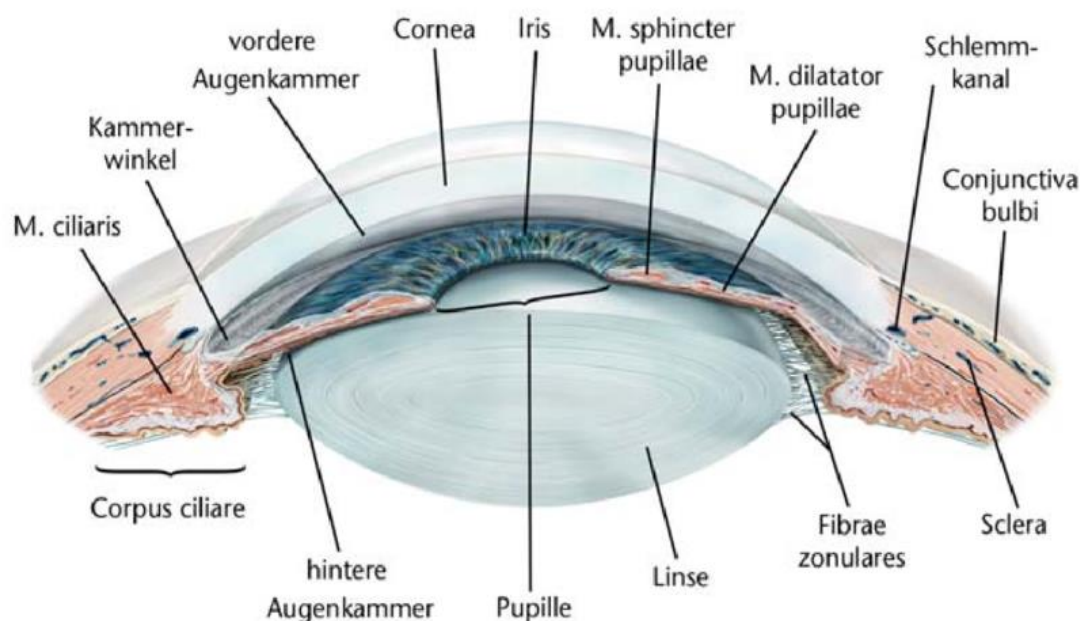
Der **M. ciliaris** kontrolliert die Krümmung der Linse. Nah-Akkommodation muss immer dann stattfinden, wenn sich ein Objekt aus der Ferne in die Nähe des jeweiligen Betrachters bewegt, damit das Objekt nach wie vor scharf abgebildet wird und nicht verschwimmt. Das Auge fokussiert, indem die Form bzw. Krümmung der Linse verändert wird. Diese Änderung geschieht dadurch, dass sich der M. ciliaris, welcher über sogenannte Zonulafasern mit der Linse verbunden ist, kontrahiert. Durch die Kontraktion des M. ciliaris erschlaffen die Zonulafasern. Beruhend auf der natürlichen Elastizität der Linse bewirkt diese Entspannung, dass die Linse sich sphärisch krümmt.

### **Lage der inneren Augenmuskeln**

Das Auge kann in einen vorderen und einen hinteren Augenabschnitt gegliedert werden. Dabei befindet sich die vordere Augenkammer direkt unterhalb der transparenten Hornhaut (Cornea), die dem Auge Schutz bietet und den größten Teil der Lichtbrechung bewirkt. Nach innen wird die vordere Augenkammer durch die Iris (Regenbogenhaut), welche für die Augenfarbe verantwortlich ist, und die Pupillenmuskeln (M. sphincter pupillae und M. dilatator pupillae) (Abb. 3). Über die Pupille steht die vordere Augenkammer mit der Linse und der hinteren

Augenkammer in Verbindung. Die Begrenzungen der hinteren Augenkammer stellen nach vorne die hintere Seite der Iris und die Pupillenmuskulatur, sowie nach hinten die Vorderseite des Glaskörpers dar. Das bedeutet, dass die Iris und der M. sphincter pupillae, sowie der M. dilatator die Hauptabgrenzung zwischen hinterer und vorderer Augenkammer bilden.

Beide Kammern sind mit Kammerwasser gefüllt. Produziert wird das Kammerwasser von spezialisierten Zellen, die in den Ziliarmuskeln vorkommen und das Kammerwasser in die hintere Augenkammer abgeben. Eine weitere, wesentliche Funktion der Mm. ciliares ist die Akkommodation (siehe 1.1.2.2). Das Kammerwasser enthält neben Elektrolyten, auch Proteine, Hyaluronsäure und Ascorbinsäure (Vitamin C). Es dient hauptsächlich zur Versorgung von Cornea und Linse mit Nährstoffen, da diese nicht direkt durchblutet werden können. Nach Verbrauch wird es zum Kammerwinkel, der sich am äußeren Rand der vorderen Augenkammer zwischen Iris und Hornhaut befindet und ein Trabekelgerüst aufweist, transportiert und in eine Vene, den sogenannten Schlemmkanal eingeschleust. Das Kammerwasser zirkuliert also von der hinteren Augenkammer in Richtung vorderer Augenkammer.



**Abbildung 3. Lage von Iris, inneren Augenmuskeln (M. ciliaris, M. sphincter pupillae, M. dilatator pupillae), sowie Vorder- und Hinterkammer.** Mit freundlicher Genehmigung von Georg Thieme Verlag: Nachdruck modifiziert aus PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: PROMETHEUS



Kopf, Hals und Neuroanatomie. Schünke, Michael et al., 2018. Abb. 5.53 A. Copyright © 2018, Rights Managed by Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York.

### **1.1.2.1 Pupillenantwort**

Es gibt zwei Hauptreaktionen der Pupille, die bekannt sind als Pupillen-Lichtreflex (PLR) und die Pupillen-Nah-Antwort (PNR) (McDougal and Gamlin, 2015). Mit der Bezeichnung PLR ist klassischerweise die Konstriktion der Pupille bei erhöhtem Lichteinfall gemeint. Während dieser auch bei Bewusstlosigkeit funktioniert, da er ohne Beteiligung des Cortex stattfindet, ist bei der PNR die Sehbahn beteiligt und damit nur im Wachzustand vorhanden.

Die PNR ist Teil der sogenannten „near triad“ (Nah-Triade), bestehend aus Konvergenz der Augen, Nah-Akkommodation und Pupillenkonstriktion beim Betrachten eines nahen Zielobjektes. Daher sind in diese Reaktion viele verschiedene Hirnareale involviert, eingeschlossen kortikale Bereiche, das Kleinhirn und das supraokulomotorische Areal (SOA)(McDougal and Gamlin, 2015).

### **Pupillenlichtreflex (PLR)**

Durch die Weit- bzw. Engstellung der Pupille wird der Lichteinfall auf die Retina geregelt. Dabei wird sowohl eine übermäßige Blendung vermieden, als auch über eine höhere Tiefenschärfe die Qualität der Abbildung unserer visuellen Umwelt optimiert. Das heißt im Umkehrschluss, je heller es ist bzw. je höher die retinale Leuchtdichte (= Menge bzw. Helligkeit des Lichts, das auf die Retina fällt) ist, desto enger/kleiner ist unsere Pupille.

Dabei kann die Verengung oder Erweiterung der Pupille unterschiedlichste Ursachen haben. Zusätzlich zu den Lichtverhältnissen hängt die Pupillenweite nämlich von unserem momentanen psychovegetativen Zustand ab. Sollten also parasympathische Einflüsse (z.B. Entspannung, Schlaf, etc.) überwiegen, so führt das zu einer Engstellung der Pupille (Schlaf: Lowenstein et al., 1963). Ein Überwiegen sympathischer Einflüsse (z.B. Angst, Schmerz, akuter Stress, freudige Erregung) hingegen führt zu einer Weitstellung der Pupille. Eine neuere Studie hat

sogar gezeigt, dass die Pupillengröße mit Emotionen verknüpft sein kann (Privitera et al., 2008).

Die jeweilige Pupillenweite wird durch das Zusammenspiel zweier glatter Muskeln eingestellt:

**M. sphincter pupillae:** Konstriktion der Pupille, parasympathische Innervation

**M. dilatator pupillae:** Weitstellung der Pupille, sympathische Innervation

Allerdings ist bekannt, dass die Pupillengröße vorwiegend von der Aktivität des parasympathischen M. sphincter pupillae bestimmt wird, da der M. dilatator pupillae ein vergleichsweise schwacher Muskel ist.

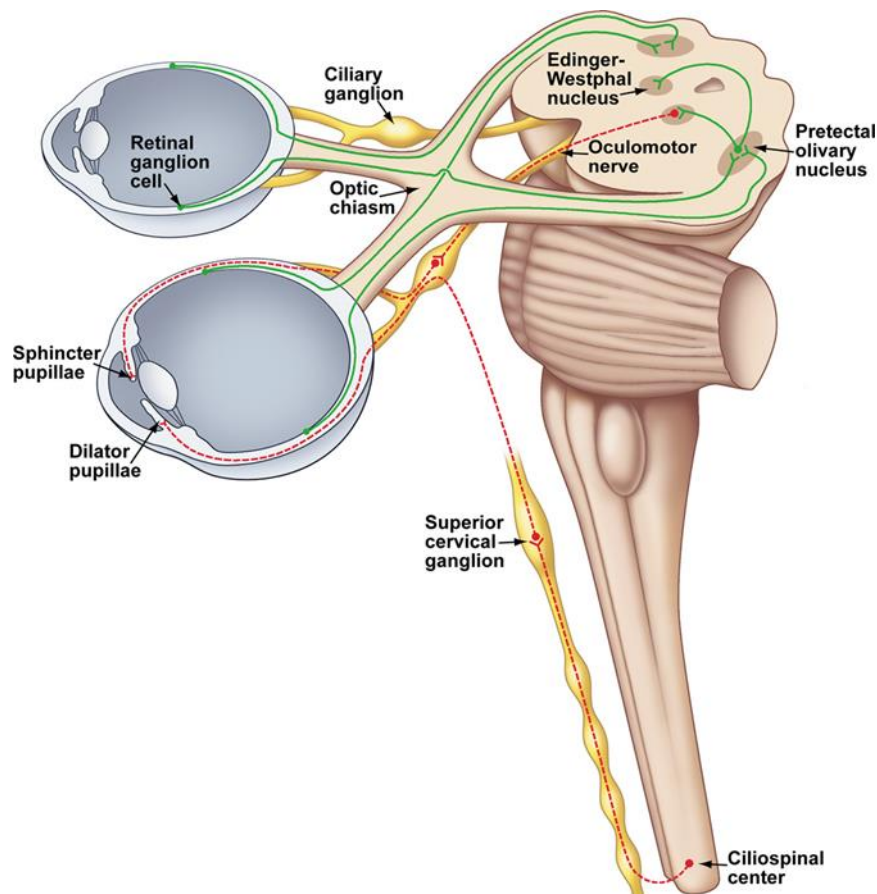
Bei einem plötzlichen Anstieg der retinalen Leuchtdichte benötigt der M. sphincter pupillae etwa 200 ms, bis er darauf reagiert und beginnt sich zu kontrahieren. Diese relativ lange Latenzzeit beruht auf einem 4-Neuronen-Reflexbogen (Abb. 4):

### **Pupillenkonstriktion (Miosis)**

1. **Neuron:** Fällt Licht in das Auge, so wird diese Information als erstes von speziellen, Melanopsin-positiven, **retinalen Ganglienzellen (intrinsische photosensitive Ganglienzellen)** aufgenommen (David M, 2003; Foster, 2005). Die Axone dieser Ganglienzellen verlaufen im Nervus und Tractus opticus. Bevor sie das Corpus geniculatum laterale erreichen, verlässt ein Teil dieser Axone den Tractus opticus, um zu den Nervenzellen des paarigen Nucleus praetectalis olivaris im Mesencephalon zu ziehen.
2. **Neuron:** Das zweite Neuron befindet sich im **Nucleus praetectalis olivaris** im Mittelhirn. Diese Neurone projizieren zu etwa gleichen Teilen zu den parasympathischen Neuronen im ipsilateralen, sowie kontralateralen Edinger-Westphal Kern (auch: Nucleus accessorius oculomotorius). Die Axone, die zur kontralateralen Seite ziehen kreuzen dabei in der Commissura posterior. Sie bilden die anatomische Grundlage für ein Phänomen, das sich konsensuelle Pupillenreaktion nennt. Dabei findet auch auf der Gegenseite eine Konstriktion

der Pupille statt, wenn man mit einer Lichtquelle in die Pupille des einen Auges leuchtet. Das bedeutet wiederum, dass die präganglionären parasympathischen Neurone im Edinger-Westphal Kern (EWpg) beidseits das gleiche supranukleäre Signal zur Einstellung der Pupillenweite erhalten. Allgemein ist zu sagen, dass die Verbindung der visuellen Afferenz mit den pupillomotorischen Zentren noch nicht vollständig erforscht ist. Beispielsweise ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt, welche zusätzlichen Eingänge der Edinger-Westphal Kern aus übergeordneten Hirnzentren bekommt, die vermutlich eine Rolle bei der Nah-Akkommodation spielen.

3. **Neuron (1. parasympathisches Neuron):** Die Neurone im Nucleus praetectalis olivaris projizieren auf die parasympathischen präganglionären Neurone im **Edinger-Westphal Kern (EWpg)**. Die Axone der präganglionären EW-Neurone verlaufen im N. oculomotorius Richtung Augapfel und ziehen über die Radix inferior des N. oculomotorius zum CG.
  
4. **Neuron (2. parasympathisches Neuron):** Im **Ganglion ciliare** befindet sich somit das zweite Neuron der parasympathischen Efferenz. Hier erfolgt die Umschaltung der präganglionären auf die postganglionären parasympathischen Neurone. Die Axone der postganglionären parasympathischen Neurone ziehen als Nervi ciliares breves zum Bulbus und damit zum **M. sphincter pupillae** (Miosis), sowie zum M. ciliaris (Nah-Akkommodation).



**Abbildung 4. Parasympathische und sympathische Innervation der Iris bei Primaten.**

Der Nucleus praetectalis olivaris erhält Input von der temporalen Retina des ipsilateralen Auges und der nasalen Retina des kontralateralen Auges. Über die commissura posterior projiziert er beidseitig zum Edinger-Westphal Kern, welcher die parasympathischen, präganglionären Neurone für die Pupillenkonstriktion enthält. Die Axone dieser präganglionären Neurone verlaufen im Nervus oculomotorius und bilden Synapsen an postganglionären Neuronen im Ganglion ciliare. Die Axone der postganglionären CG-Neurone verlassen das CG und verlaufen als Nervi ciliares breves zum Augapfel und durch die Aderhaut hindurch, um den M. sphincter pupillae zu innervieren. Die Axone derjenigen Neurone, die die Pupillenerweiterung kontrollieren, verlaufen im Truncus sympathicus und projizieren zum Ganglion cervicale superius (SCG), wo sie an den postganglionären Neuronen Endigungen ausbilden. Diese postganglionären Neurone projizieren wiederum vom SCG über den Plexus caroticus internus zum Augapfel. Die Fasern treten in den Bulbus ein, indem sie entweder durch das CG hindurch laufen und als NCB zum Bulbus ziehen, oder indem sie am CG vorbei als Nervi ciliares longi verlaufen. Wenn die Axone in den Bulbus eintreten, verlaufen sie durch die Aderhaut zum M. dilatator pupillae in der Iris. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration aus: Autonomic control of the eye. McDougal and Gamlin. J. Comp. Physiol. 2015 Jan; 5(1): 439–473. Fig. 6 © 2014, John Wiley & Sons.

### **Pupillendilatation (Mydriasis)**

An der sympathischen Pupillenreaktion, die in einer Pupillendilatation resultiert, ist das parasympathische CG nicht beteiligt. Die Aktivierung erfolgt über einen 3-Neuronen-Reflexbogen (Abb. 4):

1. **Neuron:** Das 1. sympathische Neuron befindet sich im hinteren Anteil des **Hypothalamus**. Von dort ziehen die Axone dieser Nervenzellen über die zentrale absteigende Sympathikusbahn (wahrscheinlich ipsilateral) zum ciliospinalen Zentrum im Seitenhorn der Substantia grisea des Rückenmarks zwischen C8 und Th2. Dort befindet sich die Umschaltstelle auf das 2. sympathische Neuron.
2. **Neuron:** Die Axone dieser, im **Centrum ciliospinale (C8 und TH2)** gelegenen Neurone ziehen über den Halsgrenzstrang zum Ganglion cervicale superius (Szabadi, 2018).
3. **Neuron:** Hier findet die Umschaltung auf das dritte sympathische Neuron im **Ganglion cervicale superius** statt. Im Plexus caroticus, welcher die Arteria carotis interna umgibt, verlaufen die Axone dieser Neurone ins Innere des Schädels. Sie schließen sich im Sinus cavernosus zunächst dem N. abducens und danach dem N. ophthalmicus an, dem ersten Ast des N. trigeminus (NV<sub>1</sub>). Die Endäste, Nervi ciliares longi genannt, ziehen dann zum **M. dilatator pupillae**.

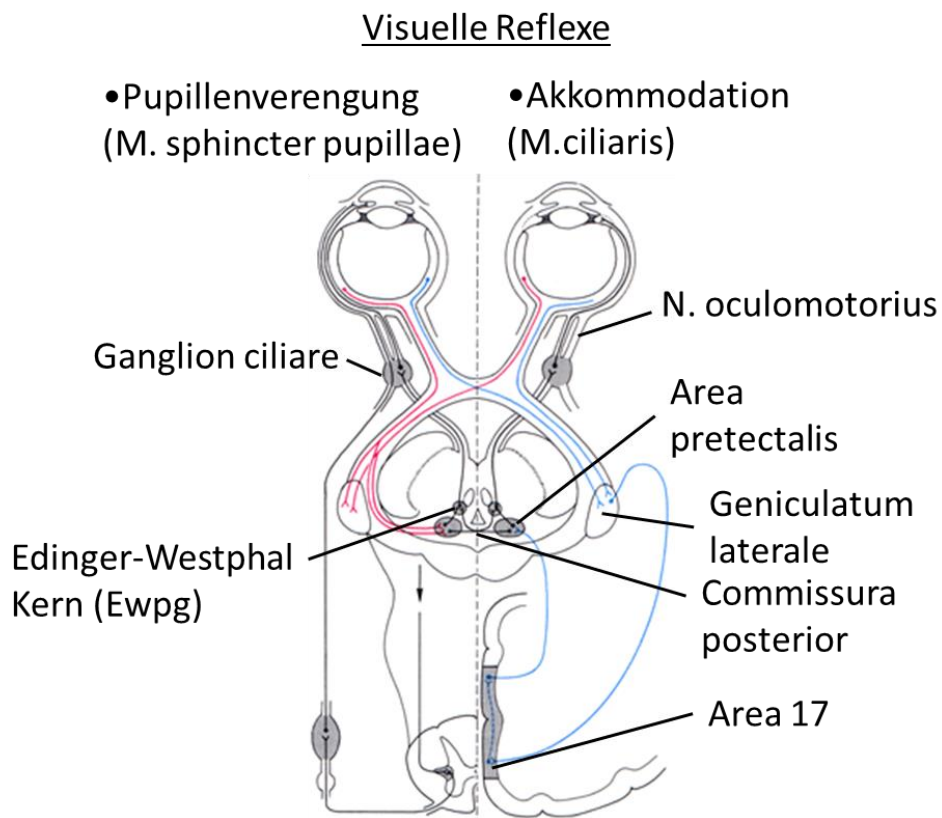
#### **1.1.2.2 Nah-Akkommodation**

Die Akkommodation erfordert eine exzellente visuelle Auflösung, eine schnelle Anpassung des Augenfokus an entfernte und nahe Zielobjekte und Bildstabilisierung (Flügel-Koch et al., 2009). Als Akkommodation wird die Fähigkeit bezeichnet die Brechkraft des Auges dynamisch anzupassen und dadurch das optische System für das Sehen in Ferne und Nähe einzustellen. Um die Brechkraft zu variieren,

verändern Säugetiere, Vögel und Reptilien bei der Akkommodation die Form der elastischen Linse, so dass das sich nähernde Objekt scharf auf der Retina abgebildet wird. Die Linse wird durch den Zug der Zonulafasern, die im Musculus ciliaris verankert sind, flach gehalten. Kontrahiert sich der **M. ciliaris** im Zuge der Nah-Akkommodation, werden diese Zonulafasern entspannt und die Linse kann sich durch ihre Eigenelastizität runden (Baumeister and Kohnen, 2008).

Die zusätzlich brechenden Medien des Auges, Cornea, Kammerwasser und Glaskörper, können ihre Brechkraft nicht variieren.

Der Reflexbogen der Nah-Akkommodation verläuft folgendermaßen (Abb. 5):



**Abbildung 5. Übersicht über die beteiligten Neuronengruppen und Faserbahnen bei Nah-Akkommodation und Pupillenkonstriktion.**

Mit freundlicher Genehmigung von Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Illustration modifiziert aus: Das Zentralnervensystem des Menschen. Nieuwenhuys, Voogd und van Huijzen. 1991. © 1991, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Die meisten Axone der rezeptiven Ganglienzellen in der Retina verlaufen im N. opticus (NII) über das Corpus geniculatum laterale zur primären Sehrinde (Area 17 nach Brodmann).

Mittels Umschaltungen über Interneurone in der Area 18 (nicht gezeigt) ziehen Axone aus der sekundären visuellen Area 19 in die Area praetectalis. Von dort ziehen die, die Nah-Akkommodation vermittelnden Axone zum EWpg, wo sie auf cholinerge, parasympathische, präganglionäre Neurone umgeschaltet werden. Dabei handelt es sich um eine eigene Gruppe präganglionärer Neurone, die sich von denen für den Pupillenreflex unterscheidet. Wie für den Pupillenreflex ziehen ihre Axone wiederum über den NIII zum Ganglion ciliare und werden dort auf postganglionäre Neurone umgeschaltet, deren Axone über die NCB den M. ciliaris aktivieren (Ruskell and Griffiths, 1979).

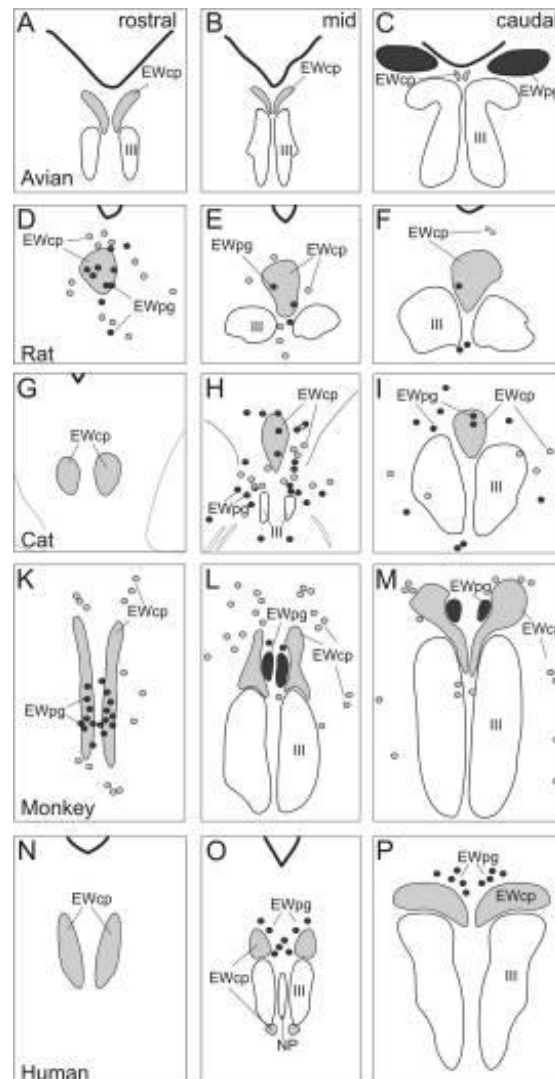
## **1.2 PRÄGANGLIONÄRE PARASYMPATHISCHE NEURONE – DER EDINGER-WESTPHAL KERN**

Die cholinergen, parasympathischen, postganglionären Neurone im Ganglion ciliare erhalten Eingänge von cholinergen, parasympathischen, präganglionären Neuronen, die im Edinger-Westphal Kern (EW) im Hirnstamm lokalisiert sind (Horn et al., 2009; McDougal and Gamlin, 2015). Der Edinger-Westphal Kern wurde erstmals in einer von Edinger durchgeführten neuroanatomischen Studie am Menschen beschrieben (Edinger, 1885) und kurz darauf in einer neuropathologischen Arbeit, durchgeführt von Westphal (Westphal 1887). Der EW oder Nucleus accessorius nervi oculomotorii zeigt sich als ein zytoarchitektonisch abgegrenztes Kerngebiet innerhalb des Mittelhirns, unmittelbar dorsomedial zu den somatischen Untergruppen des Nucleus oculomotorius (nIII) gelegen (Edinger, 1885; Westphal, 1887). Er besteht aus verhältnismäßig großen kugel- bzw. eiförmigen Zellen (Durchmesser ca. 25 – 40 µm) und weiteren spindelförmigen Neuronen (Durchmesser ca. 15 -30 µm) (Kozicz et al., 2011; Westphal 1887).

Diese präganglionären EW-Neurone projizieren über den parasympathischen Anteil des N. oculomotorius (NIII) zum CG. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass die Lage der parasympathischen, präganglionären Neurone, die zum Ganglion

ciliare projizieren und damit Pupillenkonstriktion und Nah-Akkommodation vermitteln, von Spezies zu Spezies variiert. So zeigten vergleichende Untersuchungen, dass der zytoarchitektonisch abgrenzbare EW nur beim Affen und beim Vogel die cholinergen, präganglionären Neurone enthält (Akert et al., 1980b; Gamlin and Reiner, 1991; Sun and May, 1993). In allen anderen untersuchten Wirbeltierspezies, einschließlich dem Menschen, repräsentiert der EW eine Urocortin-haltige Zellgruppe mit zentralen Projektionszielen, während die cholinergen präganglionären Neurone außerhalb der zytoarchitektonischen Grenzen des EW lokalisiert sind und verstreut um diesen liegen (Horn et al., 2008; May et al., 2008a; Horn et al., 2009). Zur genauen Unterscheidung beider Gruppen, wurde eine neue Nomenklatur eingeführt: damit bezeichnet der EWpg („preganglionic“) die präganglionären Neurone, die zum CG projizieren, der EWcp („centrally projecting“) die Urocortin-positiven Neurone, welche nach zentral projizieren (Abb. 6) (Kozicz et al., 2011).





**Abbildung 6. Organisation von EWpg und EWcp bei verschiedenen ausgewählten Spezies: Vogel (avian), Ratte (rat), Katze (cat), Affe (monkey) und Mensch (human).**

Repräsentative rostral, mittel und caudal gelegene Schnitte durch den Hirnstamm werden gezeigt.

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration aus: The Edinger-Westphal nucleus: A historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. T. Kozicz et al., J Comp Neurol. 2011 Jun 1;519(8):1413-34. Fig. 6. © 2011, John Wiley & Sons.

### 1.3 POSTGANGLIONÄRE PARASYMPATHISCHE CG-NEURONE – FUNKTIONELLE SUBPOPULATIONEN IM CG

Bekanntlich besteht das Ganglion ciliare der Vertebraten aus parasympathischen, postganglionären, cholinergen Neuronen, die zum Musculus sphincter pupillae, sowie zum Musculus ciliaris projizieren und damit Pupillenkonstriktion und Nah-Akkommodation vermitteln (Martin and Pilar, 1963a; b; Burde, 1967; Marwitt et al., 1971; Hultborn et al., 1978; Reiner et al., 1983; Neuhuber and Schrödl, 2011). Die einzige bekannte Ausnahme stellt hier das CG der Vögel dar. Zusätzlich zum M. sphincter pupillae und zum M. ciliaris wird bei dieser Spezies außerdem die Aderhaut, auch Choroidea genannt, angesteuert (Reiner et al., 1991; McDougal and Gamlin, 2015).

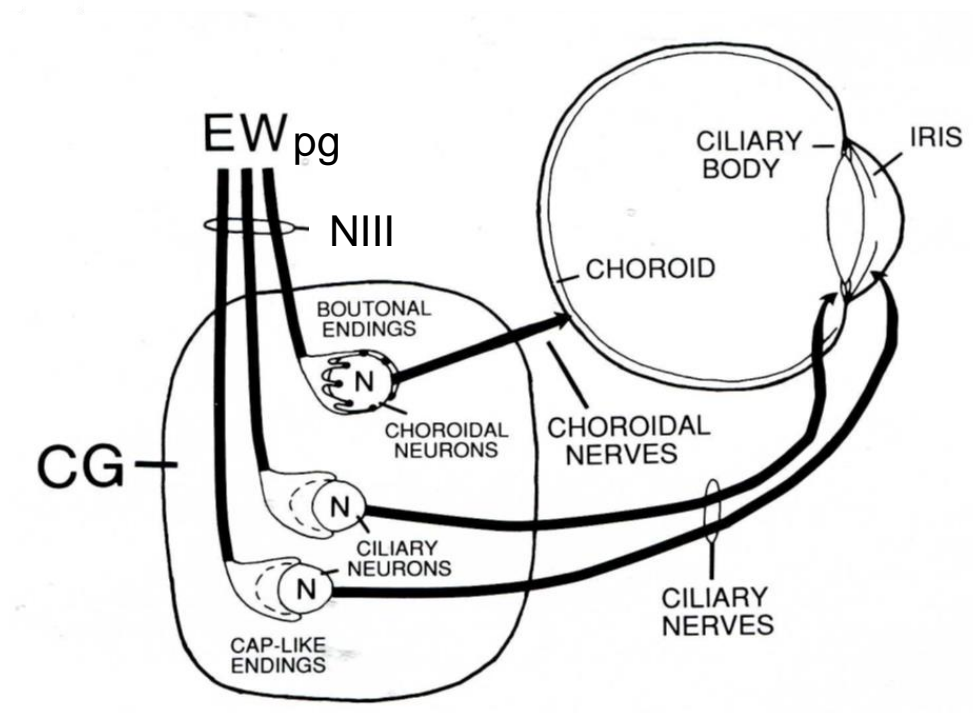
Entsprechend ihrer Beteiligung an den Reflexbögen lassen sich daher beim Affen und anderen Vertebraten (außer Vögeln) funktionell zwei Subpopulationen von postganglionären Neuronen im CG unterscheiden, eine für die Vermittlung des Pupillenreflexes (Pupillenneurone) und eine Zweite für die Vermittlung der Nah-Akkommodation (Akkommodationsneurone). Dabei wurde beim Affen gezeigt, dass nur etwa 3% zum M. sphincter pupillae projizieren. Den größten Anteil mit 97% bilden die postganglionären Neurone, die den M. ciliaris innervieren und damit Akkommodation vermitteln (Warwick, 1954). Mittlerweile wird allerdings vermutet, dass tendenziell eher eine Verteilung im Verhältnis von ca. 20% Pupillenneurone zu ca. 80% Akkommodationsneurone korrekt ist (Sun and May, 2014a; b). Morphologisch sind die beiden Populationen nicht zu unterscheiden.

Im Unterschied zum Affen findet man beim Vogel funktionell drei Gruppen postganglionärer Neurone im CG. Die Neurone für die Vermittlung der Pupillenkonstriktion und der Nah-Akkommodation werden dabei unter dem Begriff „Ciliar“-Neurone zusammengefasst. Eine dritte Population bilden die so genannten „Choroid“-Neurone. Sie innervieren die Choroidea und kontrollieren dort die Durchblutung (Hess, 1965; Landmesser and Pilar, 1970; Marwitt et al., 1971; Pilar et al., 1980; Reiner et al., 1991; McDougal and Gamlin, 2015) (Abb. 7).

Bei Säugern erfolgt die entsprechende nervale Versorgung der Aderhaut von parasympathischen Fasern im Nervus facialis, die über das Ganglion

pterygopalatinum oder Ganglienzellen direkt in der Choroidea, umgeschaltet werden (Ruskell, 1971; Lütjen-Drecoll, 2006; McDougal and Gamlin, 2015).

Während an den Ciliarneuronen immer eine einzige „kappen-ähnliche“ Terminale endet, werden die Choroidneurone von mehreren „knöpfchen-ähnlichen“ Endigungen angesteuert (Hess, 1965; Landmesser and Pilar, 1970; Marwitt et al., 1971; Pilar et al., 1980; Pilar and Johnson, 1988). Das bedeutet, dass Ciliarneurone somit morphologisch von Choroidneuronen unterschieden werden können.



**Abbildung 7. Schematische Darstellung der zwei morphologisch unterschiedlichen Terminaltypen präganglionärer Endigungen und ihrer Zielneurone im Ganglion ciliare beim Vogel.**

Die präganglionären, parasympathischen Neurone aus dem EWpg senden ihre Axone mit dem N. oculomotorius (NIII) zum CG, wo sie entweder knöpfchen-ähnliche Endigungen (boutonal endings) an Choroidneuronen, oder kappenähnliche Endigungen (cap-like endings) an Ciliarneuronen bilden. Die postganglionären CG-Neurone innervieren dann entweder die Aderhaut (choroidal neurons), oder den M. sphincter pupillae oder den M. ciliaris (ciliary neurons). Mit freundlicher Genehmigung von Cambridge University Press: Illustration modifiziert aus: Neurotransmitter organization of the nucleus of Edinger–Westphal and its projection to the avian ciliary ganglion. A. Reiner et al., Vis Neurosci. 1991 May;6(5):451-72. Copyright © 2009, Cambridge University Press.

Das Diagramm zeigt die Innervation des Auges (Orbita) und des Sinus cavernosus. Die Strukturen sind von links nach rechts: Sinus cavernosus, Orbita und Auge. Die Nerven sind farblich markiert: Rot für sympathische Fasern, Blau für sensorische Fasern und Grün für parasympathische Fasern. Die Strukturen sind: Ganglion trigeminale, NV, Plexus caroticus internus, N. nasociliaris, Sensorische Wurzel, CG, Sympathische Wurzel, Motorische Wurzel, NIII, EWpg. Die Innervation des Auges umfasst: M. dilatator pupillae, Sympathische Fasern, Konjunktiva, Sensorische Fasern, M. sphincter pupillae + M. ciliaris, Parasympathische Fasern.

Rot: sympathisch, blau: sensorisch, grün: parasympathisch

In der **sympathischen Wurzel** verlaufen Fasern, deren Nervenzellen im SCG liegen. Diese sympathischen Axone gelangen über den Plexus caroticus internus, welcher ein Geflecht aus sympathischen Nervenfasern um die A. carotis interna

darstellt, zum CG. Zusammen mit der sensorischen Wurzel treten diese Fasern von posteromedial in das CG ein (Lovasova et al., 2013). Von dort ziehen die Fasern mittels der Nervi ciliares breves zum M. dilatator pupillae (Kardon, 2005), um so für die Weitstellung der Pupille zu sorgen.

Die **parasympathische Wurzel**, die das CG von posterolateral über den N. oculomotorius (NIII) erreicht (Lovasova et al., 2013) entstammt dem präganglionären Edinger-Westphal Kern (EWpg). Die parasympathischen, präganglionären Fasern werden im CG auf die dort gelegenen parasympathischen, postganglionären Neurone umgeschaltet (Jackson, 1986) und verlaufen über die NCB zum M. sphincter pupillae und zum M. ciliaris (McDougal and Gamlin, 2015).

Beruhend auf früheren Studien passieren sowohl die sensorischen, als auch die sympathischen Nervenfasern das CG, ohne dort Synapsen an den parasympathischen, postganglionären Neuronen auszubilden (Perez and Keyeser, 1986; Lovasova et al., 2013).

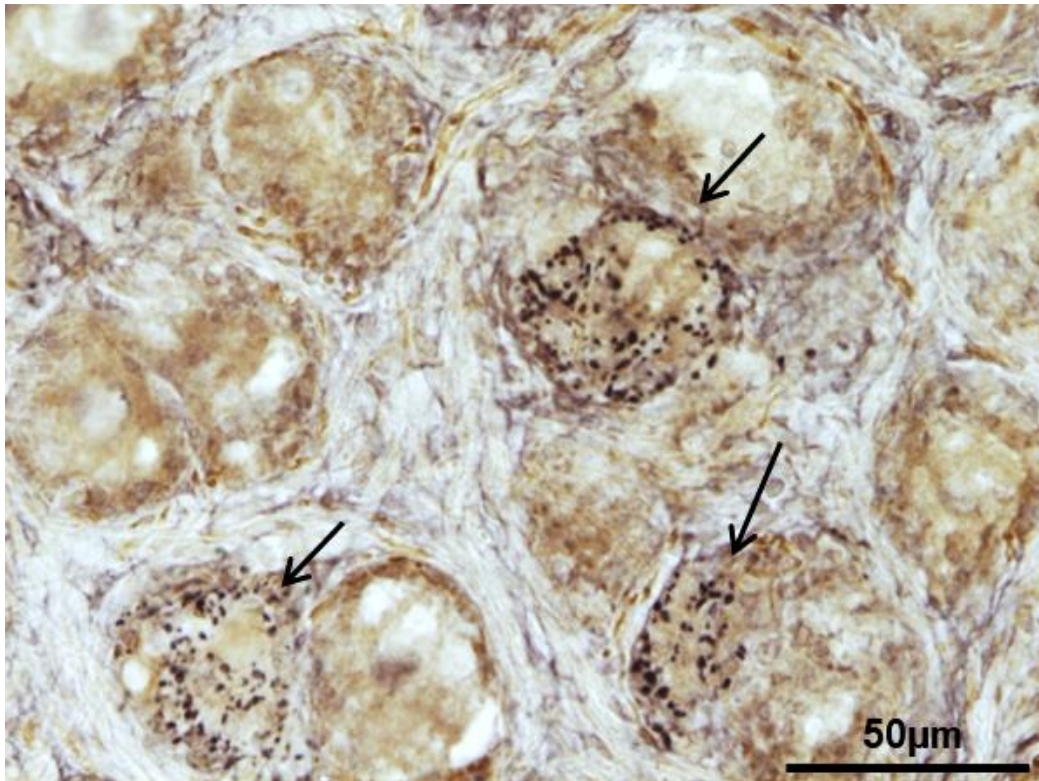
Die drei zuvor beschriebenen Wurzeln werden jedoch nicht immer in klassischer Komposition bei allen untersuchten Spezies gleichermaßen gefunden. Bei Hase und Katze fehlte beispielsweise eine sympathische Wurzel (Grimes and Von Sallmann, 1960). Beim Vogel fand Lenhossek (Lenhossek, 1910) ausschließlich eine parasympathische Wurzel. Sinnreich und Nathan (1981) berichteten außerdem, dass in einigen Fällen beim Menschen die parasympathische Wurzel ganz fehle und das CG direkt an den Ramus inferior des Okulomotoriusnervs angeschlossen sei (Sinnreich and Nathan, 1981). Dieselbe Beobachtung machten Hamel et al. (2012) in 25% der, von ihnen untersuchten menschlichen Orbitas. Zusätzlich dazu fehlte in 20% der Fälle die sympathische Wurzel. Die sensorische Wurzel vom Nervus nasociliaris war konstant vorhanden (Hamel et al., 2012).

## 1.5 WEITERE MÖGLICHE EINGÄNGE AUF DAS GANGLION CILIARE

Traditionell wird davon ausgegangen, dass das CG seinen präganglionären Input hauptsächlich von parasympathischen, cholinergen Motoneuronen aus dem EWpg erhält (Narayanan and Narayanan, 1976; Gamlin et al., 1984; Gamlin and Reiner, 1991; Vasconcelos et al., 2003; Horn et al., 2008; May et al., 2008a; May et al., 2008b; 2009; Kozicz et al., 2011). Bei Vögeln und Säugetieren durchgeführte immunhistochemische Studien lassen jedoch vermuten, dass neben dem klassischen präganglionären, cholinergen Eingang auf CG-Neurone noch ein weiterer peptiderger Eingang vorhanden ist (siehe Neuhuber and Schrödl, 2011; McDougal and Gamlin, 2015). So gibt es immunhistochemische Befunde für die Peptide Substanz P (SP) (Zhang et al., 1994b), Enkephalin (Erichsen et al., 1982a; Erichsen et al., 1982b; Kirch et al., 1995), Neuropeptid Y (NPY) (Grimes et al., 1998) und das „Calcitonin gene-related Peptide“ (CGRP) in Co-Expression mit SP (Kirch et al., 1995). Ultrastrukturelle Untersuchungen mittels elektronenmikroskopischer Methoden (EM) weisen zudem auf die Heterogenität der Eigenschaften von präganglionären Axon-Terminalen hin (May and Warren, 1993).

Zusätzlich zu den Peptiden gibt es außerdem Hinweise darauf, dass auch Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) im CG vorkommt. Studien am Huhn deuten stark darauf hin, dass die CG-Neurone mittels GABA, bekannt als schnell agierender, hemmender Neurotransmitter, kontrolliert werden können. Dies wird gezeigt durch die Expression von GABA-A Rezeptoren (McEachern et al., 1985), GABA-immunreaktiven Endigungen an CG-Neuronen im Huhn-Embryo und die komplette Blockade der Transmission durch das CG beim Huhn nach Applikation von GABA *in-vivo* und *in-vitro* (Tuttle et al., 1983; Liu et al., 2006).

Diesen GABAergen Eingang konnte ich bis dato in Form von GAD-positiven Endigungen, welche eine Subpopulation postganglionärer CG-Neurone kontaktieren, sowohl beim Vogel (ca. 50-60%), als auch beim Affen (ca. 20%) nachweisen (Abb. 9).



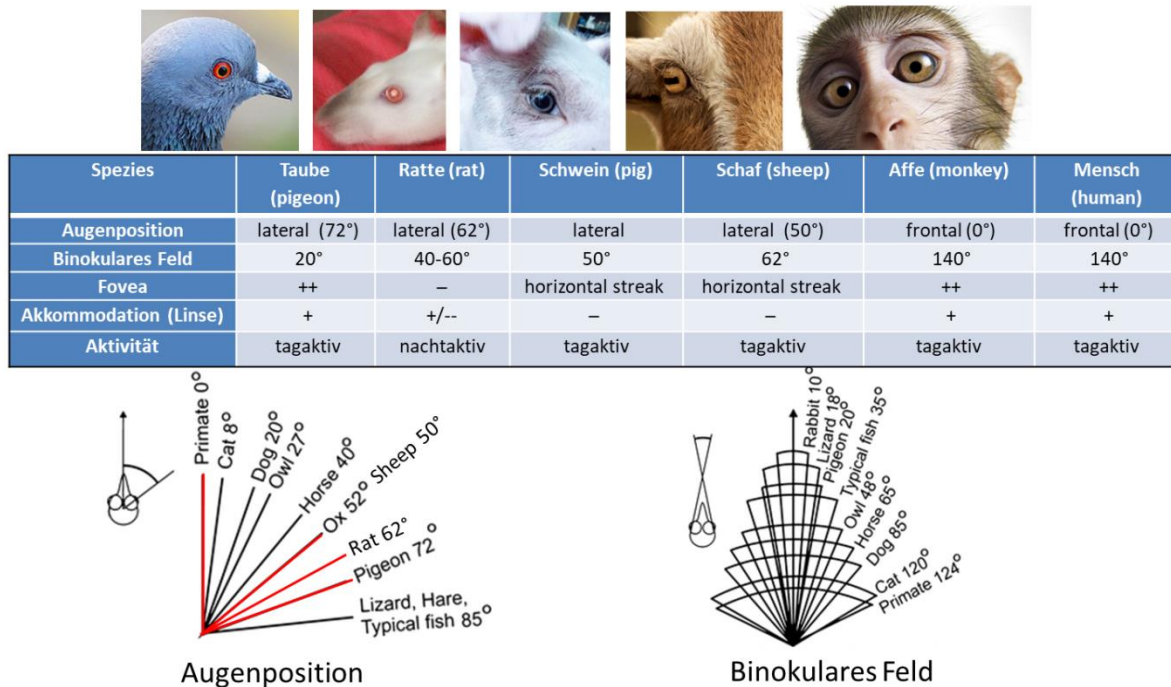
**Abbildung 9. Immunperoxidase-Färbung eines Affen-CG Gefrierschnittes.**

Cholinacetyltransferase (ChAT)-positive CG-Neurone (braun) sind von Glutamat Decarboxylase (GAD)- positive Terminalen (schwarz, Pfeile) umgeben.

## 1.6 VISUELLE FÄHIGKEITEN UND AUGENPOSITION VERSCHIEDENER SPEZIES

Verschiedene Vertebraten-Spezies unterscheiden sich bezüglich der Position der Augen (laterale vs. frontale Lage) und ihrer visuellen Fähigkeiten (Akkommodationsfähigkeit, Ausprägung des Pupillenreflexes etc.) (Abb. 10). Neben der unterschiedlichen Augenposition, variiert ebenso das Vorhandensein einer Fovea centralis zwischen den Spezies. Die Fovea centralis (oder Sehgrube) ist eine kleine Grube im Zentrum der Retina. Dieser Bereich ist der Bereich des schärfsten Sehens (Iwasaki and Inomata, 1986).





**Abbildung 10. Augenposition und visuelle/optische Eigenschaften der untersuchten Spezies.**

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature: Illustration modifiziert aus: Eye movements of vertebrates and their relation to eye form and function. Michael F. Land. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 2015 Feb;201(2):195-214. Fig. 12 © 2014, Springer Nature.

Bei der **Taube** sind die Augen lateral am Kopf positioniert, mit einem Winkel von 65°-72° zwischen optischer und sagittaler Achse. Dadurch wird dem Tier ein breites Sichtfeld ermöglicht, welches sehr wichtig für das Finden von Futter bzw. daserspähnen von Fressfeinden ist. Allerdings geht damit auch eine relativ schlechte binokulare Sicht einher (Land, 2015). Wie alle Vögel besitzt auch die Taube eine Area centralis (= Fovea centralis) mit einer hohen Dichte an Fotorezeptorzellen. Zusätzlich besitzt sie noch ein weiteres, etwas weiter temporal gelegenes Areal, das eine hohe Rezeptorzelldichte aufweist. Vögel haben einen schnellen Pupillenlichtreflex, der durch eine extensive Pupillenkonstriktion charakterisiert ist (Laurens, 1923).

Bei der **Ratte** stehen die Augen in einem Winkel von 62° zwischen optischer und sagittaler Achse. Zusätzlich sind sie um 40° aufwärts geneigt. Es gibt bei der Ratte, ebenso wie bei der Taube, ein Areal mit besonders hoher Rezeptorzelldichte,



jedoch stellt dieser Bereich keine Area centralis oder einen visuellen Streifen („visual streak“) dar (Whitteridge, 1978; Land, 2015). Deswegen besitzt die Ratte eine schlechte räumliche Sicht, obwohl sie eine relativ große Linse hat, um das Licht effektiv einzusammeln (Stone and Pinto, 1993; Nemec et al., 2008). Verhaltens- und elektrophysiologische Studien zeigten, dass Ratten eine schlechte Sehschärfe, einhergehend mit einer schlechten Bildqualität besitzen (Nemec et al., 2008). Weitere Studien lassen vermuten, dass Ratten schlecht bzw. nicht akkommodieren können, da der M. ciliaris nur sehr schwach ausgeprägt, bis gar nicht vorhanden ist (Artal et al., 1998; Schrödl et al., 2015).

Beim **Schaf** stehen die Augen in einem Winkel von ca. 48° zwischen optischer und sagittaler Achse. Dadurch, dass die Augen quasi semilateral positioniert sind, haben Schafe ein relativ kleines Binokularfeld (60°), das hauptsächlich nach medial von der Schnauze limitiert wird (Whitteridge, 1978). Wie die meisten Huftiere besitzt auch das Schaf ein visuelles Band, welches horizontal ausgerichtet ist. In fast allen Fällen wird dieses Band von einer weiteren Erhöhung der Fotorezeptorzellichte in der temporalen Region der Retina ergänzt (Land, 2015). Schafe haben eine sehr schwache Weitsicht und neigen zu Astigmatismus (Piggins and Phillips, 1966). Die physiologischen optischen Gegebenheiten produzieren für Objekte in mittlerer und weiter Entfernung ein gut-fokussiertes Bild auf der Retina, jedoch ist die Tiefenschärfe dabei schlecht. Da es keinen Hinweis darauf gibt, ob Schafe in der Lage sind zu akkommodieren (Kendrick, 1990), könnte man davon ausgehen, dass Bilder sehr naher Objekte unscharf sind. Allerdings besitzt das Schaf, wie alle Haussäugetiere ein „Tapetum lucidum“. Diese reflektierende Schicht hinter der Retina trägt zu einer verbesserten Sicht bei, vor allem in der Nacht. Des Weiteren ist die Pupille von Schafen durch ihre rechteckige Form, mit der langen Achse horizontal orientiert, charakteristisch (Piggins and Phillips, 1966). Diese Pupillenform könnte durch die Augenposition oder die Lebensweise als Herbivore bedingt sein (Banks et al., 2015).

Bis jetzt wurden beim **Schwein** hauptsächlich bezüglich des Farbsehens Studien durchgeführt. Wie dem Schaf fehlt jedoch auch dem Schwein die Fähigkeit die Linse zu akkommodieren (Tanida et al., 1991). Bei beiden Spezies ist der Geruchssinn besser ausgeprägt als der Sehsinn (Alexander and Shillito, 1977). Es ist

nicht genau bekannt in welchem Winkel die Augen zwischen optischer und sagittaler Achse stehen. Das binokuläre Feld beträgt  $50^\circ$  (Land, 2015).

Sowohl beim **Affen**, als auch beim **Menschen** stehen die Achsen beider Augen parallel zueinander (frontalständig) und decken aus diesem Grund ein großes Binokularfeld von  $124^\circ$  ab (Land, 2015). Außerdem besitzen die Augen von Affe und Mensch eine ausgeprägte Fovea, die frei von Ganglienzellen ist und es erlaubt Objekte zu fokussieren. Aus diesem Grund ist das Auge von Primaten und damit auch das des Menschen eines der komplexesten visuellen Systeme im Tierreich (Kardon, 2005). Das Akkommodationssystem ist dementsprechend hoch entwickelt, während die Fernsicht, aber auch die Nachtsicht schwach ausgeprägt ist (Campbell and Gubisch, 1966).

## 1.7 ZIELSETZUNG

Um klares binokuläres Sehen in einer dreidimensionalen Umwelt zu ermöglichen, sind Vorgänge, wie beispielsweise Linsenakkommodation, Pupillenkonstriktion und Vergenz – bekannt als Nah-Antwort – essentiell. Bei Tierarten, die eine Fovea besitzen, wie Vögel oder Primaten, sind diese Fähigkeiten sehr gut ausgeprägt. Obwohl die grundlegenden Neuronenschaltkreise bekannt und relativ gut untersucht sind, gibt es immer noch Wissenslücken bezüglich der genauen Interaktion der drei Komponenten und ihrer prämotorischen Verknüpfungen.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich einen GABAergen Input auf eine Subpopulation postganglionärer Neurone im Ganglion ciliare (CG), sowohl beim Vogel (ca. 50%), wie auch beim Rhesusaffen (ca. 20%) identifizieren können, deren Quelle vermutlich im Hirnstamm im sogenannten supraokulomotorischen Areal (SOA) liegt. Die Funktion dieser Eingänge bis dato unklar.

Folgende konkrete Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit behandelt werden:

- 1) Sind die GABAergen Eingänge auf eine Subpopulation postganglionärer CG-Neurone funktional?

Mittels Lichtmikroskopie soll untersucht werden, ob die in der Diplomarbeit identifizierten Glutamat-Decarboxylase (GAD)-positiven Knöpfchen Terminalen repräsentieren und inwieweit diese GAD-positiven Terminalen auch Cholinacetyltransferase (ChAT) enthalten.

Mittels Elektronenmikroskopie in Kombination mit Postembedding GABA-Immunhistochemie mit Immunogold soll beim Affen untersucht werden, ob es sich bei den GAD-positiven Terminalen tatsächlich um GABAerge Eingänge handelt.

Des Weiteren soll mittels elektronenmikroskopischer Methoden die Ultrastruktur aller sich im CG befindlichen Terminalen, insbesondere der GABAergen Terminalen, auf ihre Morphologie hin (symmetrische bzw. asymmetrische Synapsen) untersucht und charakterisiert werden.

Außerdem soll mit immunhistochemischen Methoden lichtmikroskopisch untersucht werden, inwieweit GABA-Rezeptoren in den post-ganglionären Neuronen exprimiert sind. Diese sind die Voraussetzung für die Bindung von GABA an die CG-Neurone und der weiterführenden Signalverarbeitung.

- 2) Welche postganglionäre CG-Neuronen-Population – pupilläre oder akkommodative - erhält den GABAergen Input und welche Funktion hat GABA damit im CG von Vertebraten?

Verschiedene Ansätze sollen dazu dienen diese Fragestellung zu adressieren:

- Mittels kombinierter Tract-Tracinginjektionen in die vordere oder hintere Augenkammer bei der Ratte und in den M. ciliaris beim Affen mit einer anschließenden Immunfärbung soll untersucht werden, inwieweit die GABAergen Eingänge auf nur eine Population postganglionärer Neurone - entweder Pupillen- oder die Akkommodationsneurone - im CG beschränkt sind und damit eher bei Pupillenkonstriktion oder Nahakkommodation eine Rolle spielen.
- Doppelimmunhistochemische Färbungen auf die Synthese-Enzyme ChAT und GAD angewendet in einem Rattenmodell (Albino vs. Wildtyp) sollen mögliche Unterschiede in der GABAergen Innervation bezüglich Vertebraten mit „normalen“ visuellen Fähigkeiten (Wildtyp) und Tieren mit akkommodationseingeschränkten Fähigkeiten (Albino) zeigen. Da Albinos gegenüber Wildtypen bekannterweise oftmals optische und okulomotorische Defizite (kaum bis keine Akkommodationsfähigkeit, Photophobie etc.) aufweisen (Prusky et al., 2002), wird dieses Projekt auf die Vermutung hin, dass es Unterschiede bezüglich der GABAergen Innervation im CG geben könnte, durchgeführt.
- Das CG von Vögeln enthält bekannterweise zusätzlich zu Pupillen- und Akkommodationsneuronen (zusammengefasst Ciliarneurone), Neurone, die zur Aderhaut projizieren (Choroidneurone). Bei anderen Vertebraten liegen diese Neurone im SCG. In einem Kompletpräparat eines Tauben-CG, angefärbt auf ChAT und GAD soll untersucht werden, inwieweit Ciliar- oder/und Choroidneurone von GAD-positiven

Terminalen kontaktiert werden. Zudem soll die topografische Beziehung von Choroid- zu Ciliarneuronen betrachtet werden.

- Mit doppelimmunhistochemischen Färbungen auf Synaptophysin (Syn) und GAD in den CG verschiedener Wirbeltierspezies (Tauben, Ratte, Schaf, Schwein, Affe und Mensch) mit unterschiedlichen visuellen Fähigkeiten und unterschiedlicher Augenposition soll untersucht werden, ob es Unterschiede bezüglich des Vorhandenseins und gegebenenfalls der Stärke der GABAergen Innervation von CG-Neuronen gibt, die Aufschluss über eine mögliche Funktion von GABA im CG geben können.

### 3) Wo befindet sich die Quelle der GABAergen Terminalen?

Mit Injektionen anterograder Tracer in den Bereich des EWpg und das angrenzende supraoculomotorische Areal (SOA) in Kombination mit immunhistochemischen Methoden soll beim Affen die Quelle der GABAergen Terminalen identifiziert werden.

Des Weiteren sollen in benachbarten Affen-Gehirnschnitten mittels einer Immunperoxidase-Färbung auf GAD bzw. ChAT etwaige doppeltmarkierte Neurone im Bereich der SOA identifiziert werden, die die Quelle der GABAergen Terminalen im CG darstellen könnten.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERWENDETES GEWEBE

Insgesamt wurden sechs verschiedene Wirbeltierspezies untersucht: Ratte (R) (*Rattus rattus*), Taube (T) (*Columba livia*), Schaf (S) (*Ovis aries*), Schwein (Sw) (*Sus scrofa domestica*), Affe (A) (*Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta* und *Macaca nemestrina*) und Mensch (M) (*Homo sapiens*).

Zu 1) Verwendetes Gewebe: A (*Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*)

- Lichtmikroskopie (Immunfluoreszenzfärbungen auf die Antigene GAD in Kombination mit Synaptophysin (Syn) und GAD in Kombination mit ChAT)
- Elektronenmikroskopie (Ultrastrukturelle Untersuchungen und Postembedding GABA-Immunhistochemie mit Immunogold)
- Immunhistochemische Doppelfärbung (Immunfluoreszenzfärbungen auf die Antigene GABA-A Rezeptor, GABA-B Rezeptor 1 in Kombination mit GAD)

Zu 2) Verwendetes Gewebe: R<sup>1</sup>, T<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, Sw<sup>4</sup>, A<sup>5</sup>(*Macaca nemestrina*), M<sup>6</sup>

- Projekt „vordere vs. hintere Augenkammerinjektion“<sup>1,5</sup>: Retrogrades Trakt-Tracing und anschließende Immunhistochemie (Immunfluoreszenzfärbungen auf den Tracer Weizenkeim-Agglutinin („wheat germ agglutinin“, WGA) bzw. die nichttoxische Untereinheit B von Cholera toxin (CTB) und GAD)
- Projekt „Wildtyp vs. Albino“<sup>1</sup>: Immunhistochemie (Immunfluoreszenzfärbungen auf die Antigene GAD und ChAT)
- Projekt „Wholemout“<sup>2</sup>: Kompletpräparat eines Tauben-CG immunhistochemisch markiert mit GAD und ChAT-Antikörpern
- Projekt „Vergleich der GABAergen Innervation bei verschiedenen Spezies“<sup>1,2,3,4,5,6</sup>: Immunhistochemie (Immunfluoreszenzfärbungen auf die Antigene GAD und Syn)

Zu 3) Verwendetes Gewebe: Affe (*Macaca mulatta* und *fascicularis*)

- Anterogrades Tract-Tracing und anschließende Immunhistochemie (Immunperoxidase- und Immunfluoreszenzfärbungen auf die Tracer

Choleratoxin (nicht toxische Untereinheit B, CT) und Biotin-Dextran-Amin (BDA) und GAD)

- Immunhistochemie in benachbarten Affen-Gehirnschnitten (Immunperoxidasefärbung auf die Antigene GAD und ChAT)

Studien bezüglich der Funktionalität von GABA im CG bestehend aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Morphologie der GABAergen Terminalen, sowie die Tract-Tracing Studien für die Herkunft der GABAergen präganglionären Neurone, welche für die GABAerge Innervation des CG verantwortlich sind, und die Studien bezüglich der GABA-Rezeptoren wurden beim Affen durchgeführt. Das verwendete Affengewebe wurde von Prof. Dr. Paul J. May (University of Mississippi, Medical Center) und Prof. Dr. Mike Mustari (Washington National Primate Research Center der Universität Washington, Seattle) zur Verfügung gestellt.

Die Tracerinjektionen wurden ebenfalls in Kollaboration mit Prof. Dr. Paul J. May und Prof. Dr. Mike Mustari durchgeführt. Alle, an den Tieren durchgeführten operativen Eingriffe zur Tracerinjektion, sowie die anschließende Perfusion fanden in den jeweiligen Institutslaboratorien und unter Einhaltung der Tierschutzgesetze in den USA (NIH Publication 85-23, Revised 1985) und Deutschland statt.



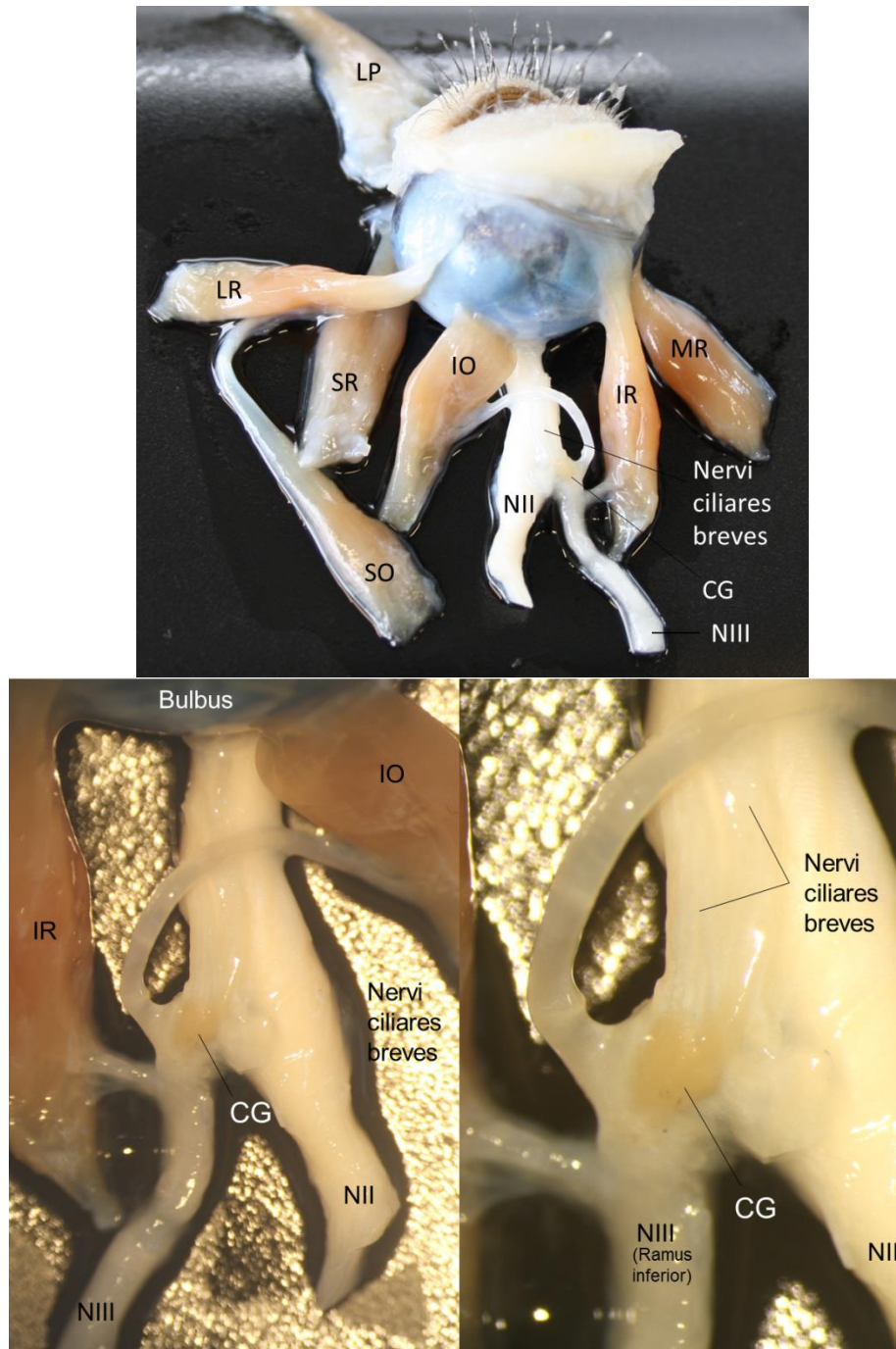
## **2.2 METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DER GABAERGEN EINGÄNGE AUF EINE SUBPOPULATION POSTGANGLIONÄRER CG-NEURONE, SOWIE CHARAKTERISIERUNG DER GABAERGEN INNERVATION DES GANGLION CILIARE BEIM RHESUSAFFEN**

Um die Funktionalität des GABAergen Inputs im CG zu bestätigen, sowie die GABAerge Innervation des Ganglion ciliare, im Besonderen die Morphologie der GABAergen Terminalen im CG genauer zu charakterisieren, wurden die CG von insgesamt 8 männlichen, jungen, ausgewachsenen Rhesusaffen (*Macaca fascicularis*), die im Rahmen anderer Forschungsprojekte als Versuchstiere verwendet worden waren, untersucht. Vor der Perfusion wurden die Tiere mit Ketamin (10mg/kg, i.v.) betäubt und anschließend mit einer Überdosis Natriumpentobarbital (>90mg/kg, i.v.) eingeschläfert. Anschließend wurden die Tiere, nach Aussetzen der Atmung, transkardial perfundiert. Dazu wurde der Thoraxraum eröffnet, die Aorta abgeklemmt, um eine Perfusion der unteren Körperhälfte zu verhindern und nach der Eröffnung des Perikards der linke Ventrikel an der Herzspitze eröffnet. In diese Öffnung wurde eine 1mm dicke Kanüle eingeführt, durch welche folgende Lösungen nacheinander zur Perfusion der oberen Körperhälfte geleitet wurden: 0,9% körperwarmer NaCl-Lösung zur Reinigung aller Gefäße von Blutbestandteilen, gefolgt von einem Fixativ (ca. 2 Liter) bestehend aus 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) bei 4°C für die lichtmikroskopische Untersuchung bzw. einer Mischung aus 1,0% PFA (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA) und 1,5% Glutaraldehyd (Fisher Chemical) in 0,1M PB (pH 7,4) für elektronenmikroskopische Studien (3 Tiere). Durch einen Entlastungsschnitt im rechten Atrium konnte die transfundierte Flüssigkeit wieder abfließen. Das Vorspülen mit NaCl-Lösung wurde so lange durchgeführt, bis die austretende Flüssigkeit nahezu farblos war. Die Perfusion mit dem Fixativ dauerte etwa 45 Minuten.

Alle verwendeten Lösungen wurden am Tag vor der Perfusion frisch hergestellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.1 Gewebeaufbereitung für Lichtmikroskopie**

Bei allen verwendeten Spezies wurden die Ciliarganglien nach der Perfusion aus der Orbita entnommen. Dafür wurde zunächst die knöcherne Augenhöhle entfernt und das Gewebe um die äußeren Augenmuskeln abpräpariert. Aufgrund des Wissens, dass sich das Ganglion ciliare, sowohl beim Affen (hier beschrieben), als auch bei allen anderen bisher untersuchten Wirbeltierspezies, zwischen dem optischen Nerv (NII) und dem Musculus rectus lateralis (LR), meist am Ramus inferior des Okulomotoriusnerven Richtung Musculus rectus inferior (IR) befindet (Lenhossek, 1910; Zhang et al., 1993; 1994a) wurden zunächst alle äußeren Augenmuskeln identifiziert und unter Schonung der Innervation frei präpariert. Das CG konnte dann als etwa 2 - 3mm großer, gelblicher, abgegrenzter Körper auf dem N. opticus sitzend, identifiziert und entnommen werden (Abb.11).



**Abbildung 11. Ganglion ciliare eines Rhesusaffen:**

**Ansicht eines frei präparierten rechten Affen Auges mit äußeren Augenmuskeln von lateral zur Lokalisation des Ganglion ciliare (CG) am Nervus opticus. Man sieht die Nervi ciliares breves und den Ramus inferior des Nervus oculomotorius.**

IO = M. obliquus inferior, IR = M. rectus inferior, LP = M. levator palpebrae, LR = M. rectus lateralis, MR = M. rectus medialis, NII = Nervus opticus, NIII = Nervus oculomotorius, SO = M. obliquus superior, SR = M. rectus superior

Nach Entfernung des Bindegewebes wurden die Ganglien in einer aufsteigenden Sucrosereihe (10%, 20% und 30% in 0.1M PB, pH 7.4) equilibriert, um das Gewebe beim anschließenden Gefrierscheiden vor Gefrierartefakten zu schützen. Es wurden 10µm -20µm dicke Schnitte an einem Kryostaten (HM, Thermo Scientific Microm, Walldorf, Germany) angefertigt und direkt auf Objektträger (Superfrost Plus, M&B Stricker, Oberschleissheim, Germany) aufgenommen. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.2 Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf GAD und Synaptophysin (Syn) oder GAD und ChAT**

Um zu untersuchen, ob GAD-positive Knöpfchen im CG synaptische Kontakte repräsentieren und, ob diese zugleich ChAT-Immunoreaktivität exprimieren, wurde an ausgewählten Gefrierschnitten eine Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf die Marker GAD und Syn, sowie GAD und ChAT durchgeführt und anschließend mit einem Konfokalmikroskop analysiert.

Synaptophysin ist ein 38kDa Glykoprotein (Wiedenmann and Franke, 1985), das in der Membran von präsynaptischen Vesikeln im Gehirn, Rückenmark, Retina, endokrinen Zellen und neuromuskulären Endplatten vorkommt. Es ist ein etablierter Marker für Synapsen (Büttner-Ennever et al., 2001; Wiedenmann und Franke, 1985).

Die Schnitte wurden nach einmaligem Waschen mit 0,1M TBS (pH 7,4) (10 min) für 1h bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 5% Eselserum und 0,3% Triton X-100 in 0,1M TBS behandelt. Anschließend folgte eine zwei-tägige (48h) Inkubation bei 4°C mit einem Cocktail aus Kaninchen anti-GAD 65/67 (1:500, Millipore, AB1511) und Ziege anti-ChAT (1:25, Millipore AB144P) bzw. Maus anti-Syn (1:20, Dako M0776) in 5% Esel-Normalserum mit 0,3% Triton X-100 in 0,1M TBS (pH 7,4). Nach dreimaligem Waschen mit 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte wiederum mit einem Cocktail inkubiert, bestehend aus einem Cy3-markierten Esel anti-Kaninchen IgG Zweitantikörper (1:200, Dianova, Jackson ImmunoResearch) und einem Esel anti-Maus bzw. anti-Ziege IgG Zweitantikörper, markiert mit Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (1:200, Molecular Probes) in 0,1M TBS (pH7.4) und 2% BSA. Die Inkubationszeit bei diesem Schritt betrug 2h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach mehrmaligem Spülen mit Puffer wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet

(im Dunkeln), anschließend mit permanentem Eindeckmedium Gel/Mount (Biomedica, San Francisco, CA) eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

### **2.2.3 Gewebeaufbereitung für Elektronenmikroskopie**

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung GABAerger Eingänge auf das Ciliarganglion wurde das mit Paraformaldehyd-/Glutaraldehyd-fixierte CG-Gewebe von 3 Affen aufgearbeitet. Des Weiteren wurden einige dieser CG-Schnitte mittels einer „postembedding“ Immunhistochemie unter Verwendung eines Immunogold-markierten Antikörpers gegen Glutaraldehyd-fixiertes GABA gefärbt (siehe Barnerssoi and May, 2016).

Wie bei der Gewebeaufbereitung für Lichtmikroskopie (siehe Punkt 2.1.1) wurden die Ganglien von Bindegewebe befreit, 2-3 mal geteilt, in der gleichen Lösung mit der perfundiert wurde für 1-2h nachfixiert und dann bis zur Aufarbeitung in PB bei 4°C aufbewahrt.

Das Gewebe wurde mit 0,1M PB (pH 7,0) gespült und dann für 2h mit 1% Osmiumtetroxid in 0,1M PB (pH 7,0) behandelt. Nach mehrmaligem Waschen mit deionisiertem Wasser, wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Acetonreihe (70%, 90%, 95%, 3 x 100%) á 10 min dehydriert. Die Einbettung der Ganglienstückchen erfolgte mittels der Platzierung des Gewebes in eine Mischung aus Durcupan ACM Epoxy (EM Sciences) und Aceton im Verhältnis 1:3 über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in dieselbe Mischung, allerdings im Verhältnis 3:1 überführt und für 3h inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe für 1h in 100% Durcupan eingelegt. Zuletzt wurden die Ganglienstückchen in frisches 100%iges Durcupan eingebettet. Das Durcupan ließ man über Nacht bei 60°C über Nacht polymerisieren. Nach dem Trimmen wurde je ein 1,0µm dicker semidünn-Schnitt von jedem Block genommen und zu Orientierungszwecken mit Toluidinblau gefärbt. Silber und gold schimmernde Ultradünnschnitte, die mit einem Glas- oder Diamantmesser an einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut E) geschnitten worden waren, wurden entweder auf 200 „mesh“ Kupfergrids für ultrastrukturelle Untersuchungen, oder für die „GABA-postembedding“ Immunhistochemie auf „nickel slot grids“, die zuvor mit Formvar (EM Sciences) behandelt worden waren, aufgezogen.

Die Schnitte auf den Kupfer-Grids wurden routinemäßigen elektronenmikroskopischen Färbe- bzw. Kontrastierungsmethoden unterzogen,

bestehend aus einer Behandlung mit 2,0% Uranylacetat (EM Sciences) für 3 min und kalziniertem Blei-Citrat („calcinated lead citrate“) für 30 Sekunden.

#### **2.2.4 „Postembedding“ Immunhistochemie auf GABA mit Immunogold**

Die Schnitte auf mit Formvar überzogenen Nickel-Grids wurden mittels einer „postembedding“ Immunhistochemie auf GABA gefärbt, um das Vorkommen GABAerger Terminalen zu untersuchen (siehe Barnerssoi & May, 2016 für Details).

Die Grids wurden 3 min lang mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, mehrmals mit deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) und zum Schluss mit 0,1M TBS (pH 7,4) gespült und danach für 30 min mit 1% BSA in 0,1M TBS (pH 7,4) inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht mit einer Lösung, bestehend aus Kaninchen anti-GABA IgG (1:75; Sigma-Aldrich A2052) in 0,1M TBS (pH 7,4) mit BSA und 0,05% Tween 20 behandelt. Die Schnitte wurden am nächsten Morgen mit 0,1M TBS/BSA/Tween 20 gespült und anschließend für 2h in einer Lösung inkubiert, bestehend aus dem Zweitantikörper Ziege anti-Kaninchen IgG versehen mit 15nm Goldpartikeln; Aurion; 1:40) und 0,1M TBS/BSA/Tween 20.

Die Grids wurden anschließend mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Zuletzt wurden die Proben mit 2% Glutaraldehyd in 0,1M PB (pH 7,0) fixiert. Für die Kontrastierung wurde, wie auch schon zuvor bei den Schnitten, die nur im Hinblick auf Ultrastruktur hin analysiert werden sollten, Uranylacetat und kalziniertes Blei-Citrat verwendet.

#### **2.2.5 Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf GAD und GABA-A Rezeptor oder GABA-B Rezeptor 1**

Um die Funktionalität eines Neurotransmitters zu überprüfen, liegt es nahe zu untersuchen, ob im analysierten Gewebe Rezeptoren für die Übertragung ebendieses Transmitters vorhanden sind.

Dafür wurden ausgewählte Gefrierschnitte von vier verschiedenen Affen-CG mittels einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit den Antikörpern gegen GAD und GABA-A Rezeptor (GABA-A) bzw. GABA-B Rezeptor 1 (GABA-B R1) gefärbt.

Die GABAerge Innervation im CG bzw. die GABAergen Terminalen wurden mittels des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamat-Decarboxylase (GAD) nachgewiesen. GAD ist ein etablierter Marker für Zellen und Terminalen, die den

Neurotransmitter Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) verwenden (Erlander et al., 1991).

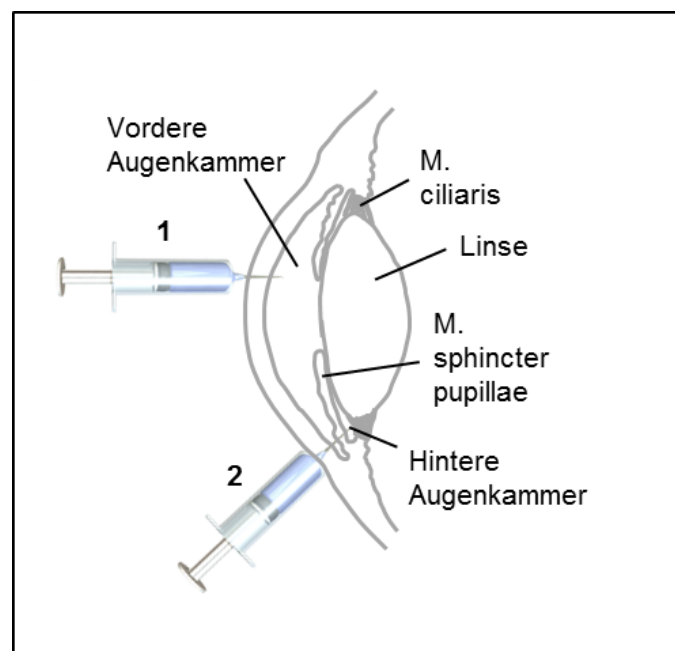
Eine Schnittserie eines jeden CG wurde mittels einer kombinierten Immunfluoreszenz-Färbung auf die Marker GAD und GABA-A oder GABA-B R1 gefärbt. Dafür wurden die Schnitte nach einmaligem Waschen mit 0,1M TBS (pH 7,4) (10 min) für 1h bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 5% Esel-Serum und 0,3% Triton X-100 in 0,1M TBS behandelt. Anschließend folgte eine zwei-tägige (48h) Inkubation bei 4°C mit einem Cocktail aus Kaninchen anti-GAD 65/67 (1:500, Millipore, AB1511) und Maus anti-GABA-A Rezeptor 2,3 beta chain (1:250; Chemicon MAB341) oder Kaninchen anti-GAD 65/67 (1:500, Millipore, AB1511) und Meerschweinchen anti-GABA-B Rezeptor 1 (1:500; Millipore AB2256) in 5% Esel-Normalserum mit 0,3% Triton X-100 in 0,1M TBS (pH 7,4). Nach dreimaligem Waschen mit 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte wiederum mit einem Cocktail inkubiert, bestehend aus einem Alexa 488-markierten Esel anti-Kaninchen IgG Zweitantikörper (1:200, Molecular Probes) und einem Esel anti-Maus oder Esel anti-Meerschweinchen IgG Zweitantikörper, markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (1:200, Dianova, Jackson ImmunoResearch) in 0,1M TBS (pH7.4) und 2% BSA. Die Inkubationszeit bei diesem Schritt betrug 2h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach mehrmaligem Spülen mit Puffer wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet (im Dunkeln), anschließend mit permanentem Eindeckmedium Gel/Mount (Biomedica, San Francisco, CA) eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.



## 2.3 METHODEN ZUR BETEILIGUNG DES GABAERGEN INPUTS IM CG AN DER PUPILLENKONSTRIKTION ODER DER NAH-AKKOMMODATION – FUNKTION

### 2.3.1 Identifizierung funktionell unterschiedlicher, postganglionärer Neurone im CG

Für dieses Projekt erhielten insgesamt 4 Ratten (R35/R36/R40/R44) eine retrograde Tracer-Injektion mit Choleratoxin nichttoxische Untereinheit B (CTB) oder Weizenkeimagglutinin (WGA) (Abb. 12) in die vordere (1) bzw. die hintere Augenkammer (2). Zusätzlich erhielt ein Makake (*Macaca nemestrina*) eine WGA-Injektion in den M. ciliaris.



**Abbildung 12.** Schema einer Tract-Tracer-Injektion in die vordere (1) bzw. hintere (2) Augenkammer mit retrogradem Transport.

Ziel dieses Versuchs war es diejenigen Neurone, die im CG für die Pupillenkonstriktion zuständig sind, also die „Pupillenneurone“ gegenüber denjenigen, die im CG für Nah-Akkommodation zuständig sind, also die „Akkommodationsneurone“, abzugrenzen. Mit einer anschließenden immunhistochemischen Reaktion auf den verwendeten Tracer (10% Weizenkeimagglutinin, WGA bzw. 1% CTB) und GAD sollte untersucht werden, ob

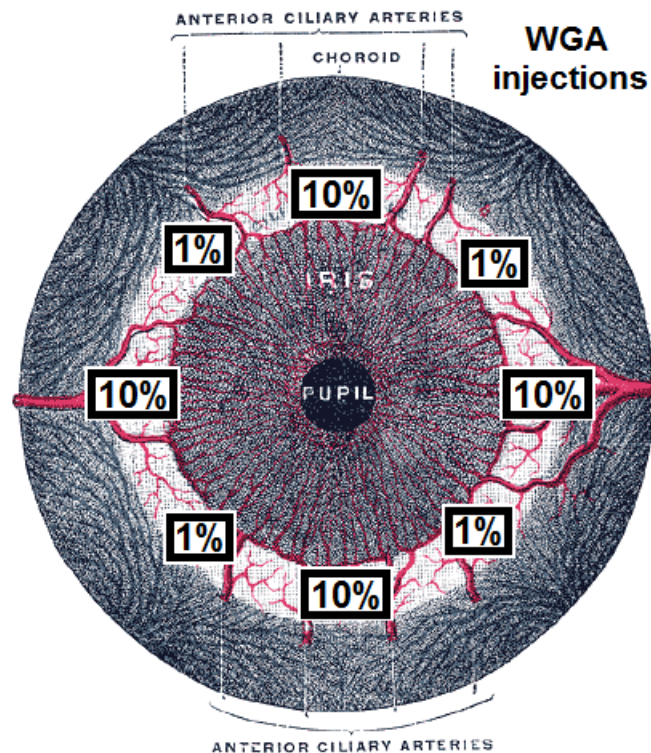


ausschließlich Pupillenneurone oder Akkommodationsneurone eine GABAerge Innervation erhalten.

### **Retrogrades Tract-Tracing**

Vier Ratten (Brown Norway) erhielten eine antagonisierbare Injektionsnarkose mit 0,15 mg/kg Medetomidin + 2,0 mg/kg Midazolam + 0,005 mg/kg Fentanyl. Unter sterilen Bedingungen wurden ca. 4µl 10%iges WGA (Sigma, St. Louis, MO, USA) bzw. 1%iges CTB mit einer Hamilton Spritze in die vordere bzw. hintere Augenkammer injiziert. Nach einer Überlebenszeit von 3-4 Tagen wurden die Tiere eingeschläfert, mit 4% PFA perfundiert und das Gehirn, sowie die Ciliarganglien zur weiteren Untersuchung entnommen. Da das CG bei der Ratte jedoch zu klein ist, um es wie beim Affen separat zu entnehmen, wurde der gesamte optische Nerv, zusammen mit dem ihn umgebenden Bindegewebe entnommen und dieser komplett längs gefriereschnitten (10µm).

Der Makake erhielt mehrere kleine WGA-Injektionen in den M. ciliaris durch Prof. Mustari (Abb. 13). Sie fanden allesamt unter sterilen Bedingungen und in dafür vorgesehenen Räumlichkeiten unter Isofluran-Narkose (1,25 - 2,5%) statt.



**Abbildung 13.** Injektionsstellen der 8 kleinen WGA-Injektionen (10% und 1%) in den M. ciliaris eines Affen (*Macaca nemestrina*).

### **Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf WGA bzw. CTB und GAD**

Die Doppelimmunfluoreszenz-Färbung funktioniert grundsätzlich wie in Punkt 2.2.2 beschrieben.

Ausgewählte CG-Gefrierschnitte wurden auf den Tracer Weizenkeim-Agglutinin (Ziege anti-WGA, 1:250; Axxora, Germany) bzw. CTB (Ziege anti-CTB) und Kaninchen anti-GAD (1:500) gefärbt. Die Erstantikörper wurden anschließend mit Cy3 Esel anti-Ziege (1:200, Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA; WGA) und Alexa488 Esel anti-Kaninchen (1:200; Molecular Probes, Oregon, USA; GAD) visualisiert. Das Eindeckeln erfolgte mit Fluoromount Medium (SIGMA-ALDRICH, MO, USA).

**Doppelimmunperoxidase-Färbung auf WGA und GAD**

Ausgewählte CG-Gefrierschnitte eines Affen (*Macaca nemestrina*), der zuvor mehrere kleine WGA-Injektionen in den M. ciliaris erhalten hatte, wurden mittels einer Doppelimmunperoxidase-Färbung auf den Tracer (WGA) und GAD gefärbt.

Dafür wurden die Schnitte 1 x 10 min in 0,1M Tris-gepufferter Kochsalzlösung („tris buffered saline“, TBS, pH 7,4) gewaschen und anschließend für 30 min mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS (pH 7,4) behandelt, um die Aktivität endogener Peroxidasen zu unterdrücken. Im Anschluss wurden die Schnitte wiederum mit TBS (pH 7,4) gewaschen (3 x 10 min) und für 1h bei Raumtemperatur mit 5% Pferde-Normalserum in 0,3% Triton X-100 (Sigma) in 0,1M TBS (pH 7,4) behandelt, damit unspezifische Bindungsstellen vor der eigentlichen Antigen-Antikörperbindung gesättigt werden. Für die Antigen-Antikörperbindung wurden die Schnitte in einer Lösung, bestehend aus einer 1:2000 Verdünnung des Kaninchen anti-GAD 65/67 Antikörpers (Millipore AB1511) in TBS (pH 7,4) mit 5% Pferde-Normalserum in 0,3% Triton X-100 für 48h bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem 3-maligem Waschen (à 10 min) mit 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Lösung, bestehend aus einem biotinylierten Pferd anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:200, Vector) in 0,1M TBS (pH 7,4) und 2% Rinderserumalbumin behandelt. Nach wiederholtem Waschen (3 x 10 min) in 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte für 1h in einer Lösung aus ExtrAvidin-Peroxidase (EAP, 1:1000, Sigma) in 0,1M TBS (pH 7,4) inkubiert, gewaschen und im Anschluss mit 0,025% Diaminobenzidin HCL (DAB), 0,2% Ammonium-Nickel-Sulfat und 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05M TBS (pH 8,0) für 10 min reagiert, um ein schwarzes Reaktionsprodukt in GAD-positiven Endigungen zu erhalten. Nach 3-maligem Waschen wurden die Schnitte nochmals derselben Prozedur unterzogen. Als Erst-Antikörper wurde Ziege anti-WGA (1:250; Axxora) verwendet, als biotinylierter Zweit-Antikörper Pferd anti-Ziege IgG (1:200, Vector). Die 10-minütige Inkubation mit 0,025% Diaminobenzidin HCL (DAB) und 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05M TBS (pH 8,0) resultierte in einem braunen Reaktionsprodukt in WGA-positiven Neuronen.

### **2.3.2 Projekt “Albino vs. Wildtyp” – Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf ChAT und GAD**

Für dieses Projekt wurde das CG-Gewebe von 3 Albino- und 4 Wildtyp-Ratten verwendet. Ausgewählte CG-Gefrierschnitte wurden mittels einer doppelimmunhistochemischen Fluoreszenzfärbung auf GAD und ChAT gefärbt (siehe Punkt 2.2.2) und anschließend analysiert.

### **2.3.3 Projekt Taube „Wholemount“**

Um die topographische Verteilung der beiden unterschiedlichen Neuronensubpopulationen (Choroid- und Ciliarneurone) und ihre jeweiligen morphologisch unterschiedlichen Terminalentypen im Tauben-CG zu untersuchen, wurde ein Tauben-CG als Kompletpräparat (Wholemount) immunhistochemisch auf GAD und ChAT gefärbt und das Gewebe anschließend durchsichtig gemacht („clearing“). Zuerst wurde das komplette CG 3 Mal für je 30 min, oder über Nacht mit 0,1M PBS (pH 7,4) gewaschen. Im Anschluss wurde das CG in Dent's Fix (1x 100% DMSO : 4x 100% Methanol) überführt, um das Gewebe nachzufixieren. Nach 3-maligem Waschen für je 30 min mit 0,1M PBS (pH 7,4), wurde das Gewebe über 3 Zyklen eingefroren (flüssiger Stickstoff) und wieder aufgetaut (0,1M PBS + 1% Triton X). Im Anschluss wurde das CG für 30 min in 0,5% Triton in 0,1M PBS (pH 7,4) gespült und danach mit 10µg/ml Proteinkinase K in PBS für 5 min zur enzymatischen Verdauung reagiert. Nach weiterem 3-maligen Waschen in 0,5% Triton in 0,1M PBS wurde das CG in 10% Esel-Normalserum mit 0,5% Triton und 5% DMSO in 0,1M PBS für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Das Gewebe wurde im Anschluss mit einem Erstantikörper-Cocktail, bestehend aus Kaninchen anti-GAD (1:500) und Ziege anti-ChAT (1:25) für 6 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem 30-minütigem Waschen in 0,5% Triton in 0,1M PBS wurde das CG im Zweitantikörper-Cocktail, bestehend aus den fluoreszierenden Zweitantikörpern Cy3-markiertes Esel anti-Kaninchen IgG (1:200, Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA) und Alexa 488-markiertes Esel anti-Ziege IgG (1:200, Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA) für 2 Tage bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das CG wiederholt in 0,5% Triton in 0,1M PBS für 30 min gewaschen. In einem finalen Schritt wurde das Gewebe im

Dunkeln durchsichtig gemacht, indem die Probe durch eine Reihe verschiedener Mischverhältnisse von Methanol: BABB (1x BA (Benzylalkohol) + 2x BB (Benzylbenzoat)) transferiert wurde, Anfangen von 3:1 (MeOH: BABB), danach 1:1 (MeOH: BABB), 1:3 (MeOH: BABB) und letztendlich 100 % BABB für je 15 min, bis das Gewebe transparent war.

Zur Analyse unter dem Konfokalmikroskop wurde das komplette CG auf einen Objektträger gelegt und mit einem Tropfen BABB und einem Deckglas bedeckt.

### **2.3.4 Projekt “Vergleich der GABAergen Innervation bei verschiedenen Spezies”**

Für diesen Versuch wurde das CG-Gewebe von sechs verschiedenen Wirbeltierspezies vergleichend untersucht: Ratte (7 Tiere), Taube (4 Tiere), Schwein (2 Tiere), Schaf (2 Tiere), Affe (10 Tiere) und Mensch (2 Individuen). Ergebnisse bzw. Prozentzahlen bezüglich des GABAergen Inputs lagen für die Spezies Ratte und Affe auf Grund der vorherigen Versuche bereits vor.

Das CG-Gewebe der Spezies Ratte, Taube und Affe wurde nach vorausgegangener Perfusion der Tiere mit 4% PFA (Reiner et al., 1991; Hittinger and Horn, 2012), entnommen und anschließend für die folgende Immunhistochemie mit lichtmikroskopischer Auswertung aufbereitet (siehe Punkt 2.2.1). Die CG der anderen drei Spezies (Schwein, Schaf und Mensch) wurden post mortem unfixiert aus der Orbita entnommen und anschließend für mehrere Stunden mit 4%igem PFA fixiert, bevor sie in 0,1M Phosphatpuffer zur weiteren Aufbewahrung überführt wurden. Je ein CG pro Spezies wurde nach Standardmethoden in Paraffin eingebettet.

Im weiteren Verlauf wurden Gefrierschnitte (10µm) bzw. Paraffinschnitte (5 – 7µm) angefertigt, die bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C (Gefrierschnitte) bzw. bei Raumtemperatur (Paraffinschnitte) gelagert wurden.

### **Doppelimmunfluoreszenz-Färbung auf GAD und Synaptophysin (Syn)**

Zur Verifikation, dass es sich bei den GAD-positiven knöpfchenähnlichen Strukturen tatsächlich um Synapsen handelt, wurden ausgewählte Gefrierschnitte bei

allen untersuchten Spezies auf die Marker GAD und Syn (Dawson et al., 1992) getestet. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend mit einem Konfokalmikroskop analysiert.

Die Färbung wurde, wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, durchgeführt.

Paraffinschnitte wurden vor Anwendung des Färbeprotokolls nach Standardmethoden entparaffiniert. Dafür wurden die Schnitte 3 mal für 5, 15 und 30 Minuten in Xylol inkubiert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 70% á 5 min) rehydriert und danach für 10 min mit destilliertem Wasser gespült. Für die Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte in 0,01M Citratpuffer für 15min bei 80°C erhitzt. Anschließend ließ man die Schnitte im Puffer für 15 min bei Raumtemperatur abkühlen. Danach wurden sie kurz mit destilliertem Wasser abgespült und in 0,1M TBS (pH 7,4) zur weiteren Verwendung überführt.

## **2.4 METHODEN ZUR LOKALISATION DER QUELLE DER GABAERGEN TERMINALEN IM CG BEIM RHESUSAFFEN**

### **2.4.1 Anterogrades Tract-Tracing**

Um die Quelle der GABAergen Innervation im CG ausfindig zu machen, wurde der Tracer Biotin Dextran Amin (BDA) oder die nichttoxische Untereinheit B von Cholera toxin (CTB) zentral in den Bereich des präganglionären Edinger-Westphal-Kerns sowie dem dorsal dazu gelegenen supraokulomotorischen Areal im Mittelhirn injiziert. In früheren Studien wurde festgestellt, dass besonders BDA ein sehr guter anterograder Tracer ist (Brandt and Apkarian, 1992), welcher jedoch ebenso retrograd verwendet werden kann (Reiner et al., 2000).

Das Gleiche gilt für die nicht toxische Untereinheit B von CT (Angelucci et al., 1996).

Der Tracer wird anterograd entlang des Axons zur Terminale transportiert und kann im Anschluss dort mittels immunhistochemischen Methoden sichtbar gemacht werden. Eine kombinierte Färbung auf den Tracer, sowie GAD (hier) zeigt, ob diejenigen Neurone, die möglicherweise die Quelle der GABAergen Terminalen im CG darstellen, erfasst wurden. Die zentralen Tracerinjektionen in den Nucleus oculomotorius, sowie den darüber gelegenen Edinger-Westphal Kern und das supraokulomotorische Areal, wurden an 4 gesunden, jungen Rhesus Affen der Gattung *Macaca mulatta* bzw. *fascicularis* vorgenommen. Ihnen wurde nach Perfusion neben den Ciliarganglien zusätzlich das Gehirn zur immunhistochemischen Aufarbeitung bzw. zur Detektion der genauen Tracerinjektionsstelle entnommen.

Die operativen Eingriffe erfolgten durch Prof. Mustari bzw. Prof. May und fanden allesamt unter sterilen Bedingungen und in dafür vorgesehenen Räumlichkeiten unter Isofluran-Narkose (1,25 - 2,5%) statt (Lienbacher et al., 2011). Vitalzeichen, wie Blutdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur und Sauerstoffkonzentration im Blut, sowie abgeatmetes CO<sub>2</sub> wurden mit einem Surgivet Instrument (Waukesha, WI) überwacht. Die Werte lagen ständig im physiologischen Normbereich. Nach den Operationen wurden für einige Tage Analgetika (Buprenorphine 0.01 mg/kg, alle 6 Stunden) und entzündungshemmende Medikamente (Banamine 1.0 mg/kg, alle 6 Stunden) verabreicht. Mit Hilfe von

stereotaktischen Methoden wurde eine Titan-Platte zur Stabilisierung des Kopfes, sowie eine Führungshilfe für die Ableitelektroden implantiert (Crist Instruments, Hagerstown, MD). Die Führungshilfen für Ableitungen im Nucleus oculomotorius (nIII) wurden stereotaktisch bei anterior = 2 mm, lateral = 1 mm und mit 20° Neigung von der Mittellinie eingesetzt und anschließend so ausgerichtet, dass eine Elektrode, die zentral eingeführt wurde, einen Punkt in der Nähe des nIII traf. Die Injektionsstellen wurden durch Ableitungen im Nucleus oculomotorius (nIII) und Nucleus trochlearis (nIV) aufgrund ihrer charakteristischen „Burst-tonic-Antworten“ in Verbindung mit sakkadischen Augenbewegungen identifiziert. Nach Abschluss der Orientierung und Kartierung im Gehirn wurde die Ableitelektrode durch eine Hamilton Spritze oder eine speziell hergestellte Mikropipette ersetzt. Diese besitzt eine angeschrägte Spitze (20-50µm Durchmesser) und ist durch einen Polyethylenschlauch mit einer Pikoliter Pumpe (WPI (830) verbunden. Das injizierte Tracervolumen kann anhand der Bewegung des Meniskus im Schlauch (40nl/mm) abgelesen werden. Durch kurze Druckpulse (50ms) wurden immer wieder kleine Mengen Tracer injiziert. Die Injektion setzte sich somit über mehrere Minuten fort. Dadurch sollte erreicht werden eine zu starke Ausbreitung des Tracers zu vermeiden. Die Pipette wurde 5-10 Minuten nach der Injektion schrittweise mit Hilfe eines Mikromanipulators entfernt.

#### **2.4.2 Nachweis der doppelt-markierten Endigungen – Immunfluoreszenzfärbung auf BDA bzw. CTB und GAD**

Die Doppelimmunfluoreszenz-Färbung wurde durchgeführt wie unter Punkt 2.2.2 bzw. 2.3.1 beschrieben.

Ausgewählte CG-Gefrierschnitte wurden auf den Tracer Biotindextran-Amin (BDA) bzw. CTB (Ziege anti-CTB) und Kaninchen anti-GAD (1:500) gefärbt. Die Erstantikörper wurden anschließend mit Cy3 Esel anti-Ziege (1:200, Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA; WGA) und Alexa488 Esel anti-Kaninchen (1:200; Molecular Probes, Oregon, USA; GAD) visualisiert. Das Eindeckeln erfolgte mit Fluoromount Medium (SIGMA-ALDRICH, MO, USA).



### 2.4.3 Immunoperoxidase-Färbung auf GAD und ChAT

Als weitere Methode zur Identifizierung der Quelle der GABAergen Eingänge aus dem Mittelhirn wurden ausgewählte benachbarte Paraffinschnitte eines Affengehirns (Fall B66) aus dem Bereich des nIII/EW/SOA mittels der Antikörper GAD und ChAT gefärbt.

Die, bereits auf Objektträger aufgezogenen Schnitte (7µm) wurden zuerst nach einem Standardprotokoll entparaffiniert (siehe 2.3.4).

Im Anschluss wurde eine Serie mittels einer Immunoperoxidase-Färbung auf das Antigen ChAT gefärbt, die benachbarte Schnittserie auf GAD.

Dafür wurden die Schnitte 1 x 10 min in 0,1M Tris-gepufferter Kochsalzlösung („tris buffered saline“, TBS, pH 7,4) gewaschen und anschließend für 30 min mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS (pH 7,4) behandelt, um die Aktivität endogener Peroxidasen zu unterdrücken. Im Anschluss wurden die Schnitte wiederum mit TBS (pH 7,4) gewaschen (3 x 10 min) und für 1h bei Raumtemperatur mit 5% Pferde-Normalserum in 0,3% Triton X-100 (Sigma) in 0,1M TBS (pH 7,4) behandelt, damit unspezifische Bindungsstellen vor der eigentlichen Antigen-Antikörperbindung gesättigt werden. Für die Antigen-Antikörperbindung wurden die Schnitte in einer Lösung, bestehend aus einer 1:2000 Verdünnung des Kaninchen anti-GAD 65/67 Antikörpers (Millipore AB1511) oder Ziege anti-ChAT (1:25, Millipore AB144P) in TBS (pH 7,4) mit 5% Pferde-Normalserum in 0,3% Triton X-100 für 48h at 4°C inkubiert. Nach anschließendem 3-maligem Waschen (à 10 min) mit 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Lösung, bestehend aus einem biotinylierten Pferd anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:200, Vector) oder Pferd anti-Ziege IgG Antikörper (1:200, Vector) in 0,1M TBS (pH 7,4) und 2% Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“, BSA) behandelt. Nach wiederholtem Waschen (3 x 10 min) in 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte für 1h in einer Lösung aus ExtrAvidin-Peroxidase (EAP, 1:1000, Sigma) in 0,1M TBS (pH 7,4) inkubiert, gewaschen und im Anschluss mit 0,025% Diaminobenzidin HCL (DAB), 0,2% Ammonium-Nickel-Sulfat und 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05M TBS (pH 8,0)(für GAD) bzw. 0,025% Diaminobenzidin HCL (DAB) und 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05M TBS (pH 8,0)(für ChAT) für 10 min reagiert, um ein schwarzes Reaktionsprodukt in GAD-

positiven Neuronen bzw. ein braunes Reaktionsprodukt in ChAT-positiven Neuronen zu erhalten.

Die Schnitte wurden eingescannt und mithilfe der Mirax Viewer Software analysiert oder mit Neurolucida ausgeplottet. Bilder wurden mit oben genannter Kamera an oben genanntem Mikroskop aufgenommen.

## 2.5 TABELLE DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER

Name	Erstantikörper	Zweitantikörper
<b>Glutamat-Decarboxylase 65/67 (GAD); Hellfeld</b>	Kaninchen anti-GAD 65/67; 1:2000; Millipore AB1511	biotinylierter Pferd anti-Kaninchen; 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, USA
<b>Glutamat-Decarboxylase 65/67 (GAD); Fluoreszenz</b>	Kaninchen anti-GAD 65/67; 1:500; Millipore AB1511	Cy3 Esel anti-Kaninchen; 1:200; Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA oder Alexa 488 Esel anti-Kaninchen; 1:200; Molecular Probes/Invitrogen, Eugen, Oregon, USA
<b>Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT); Hellfeld</b>	Ziege anti-ChAT; 1:100; Millipore AB144P	biotinylierter Pferd anti-Ziege; 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, USA
<b>Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT); Fluoreszenz</b>	Ziege anti-ChAT; 1:25; Millipore AB144P	Alexa 488 Esel anti-Kaninchen; 1:200; Molecular Probes/Invitrogen, Eugen, Oregon, USA
<b>Synaptophysin (Syn); Fluoreszenz</b>	Maus anti-Syn; 1:20; DAKO M0776	Alexa 488 Esel anti-Maus; 1:200; Molecular Probes/Invitrogen, Eugen, Oregon, USA
<b>GABA-A Rezeptor (GABA-A); Fluoreszenz</b>	Maus anti-GABA-A Rezeptor 2,3 beta chain; 1:250; Chemicon MAB341	Cy3 Esel anti-Maus; 1:200; Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
<b>GABA-B Rezeptor 1 (GABA-B R1); Fluoreszenz</b>	Meerschweinchen anti-GABA-B Rezeptor 1; 1:500; Millipore AB2256	Cy3 Esel anti-Meerschweinchen; 1:200; Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
<b>Gamma-Amino-Buttersäure (GABA), EM</b>	Kaninchen anti-GABA IgG; 1:75; Sigma-Aldrich A2052	15nm Goldpartikel Ziege anti-Kaninchen IgG; 1:40; Aurion
<b>Weizenkeim-Agglutinin (WGA), Hellfeld</b>	Ziege anti-WGA; 1:1000; Axxora Germany	biotinylierter Pferd anti-Ziege; 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, USA
<b>Weizenkeim-Agglutinin (WGA), Fluoreszenz</b>	Ziege anti-WGA; 1:250; Axxora Germany	Cy3 Esel anti-Ziege; 1:200; Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
<b>Choleratoxin Untereinheit B (CTB), Fluoreszenz</b>	Ziege anti-Choleragenoid; 1:5000;	Cy3 Esel anti-Ziege; 1:200; Dianova, Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
<b>Choleratoxin Untereinheit B (CTB), Fluoreszenz</b>	Ziege anti-Choleragenoid; 1:20000;	biotinylierter Pferd anti-Ziege; 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, USA

Tabelle 1. Liste der verwendeten Antikörper und ihrer Quellen mit angewendeten Methoden.

## 2.6 ANALYSE & DOKUMENTATION

### Lichtmikroskopie

Die Schnitte wurden mit einem von zwei Lichtmikroskopen (Leica; DMRB, Bensheim, Germany, oder Zeiss; Axioplan, MicroImaging, Oberkochen, Germany), entweder mit Hellfeld-Einstellungen (Schnitte mit Doppelimmunperoxidase-Färbung), oder unter Verwendung von Filtern für Rot-Fluoreszenz (Cy3)(Leica: N2.1; excitation filter BP 515–560 nm, dichromatic mirror 580nm, suppression filter LP 590 nm; Zeiss: excitation filter BP 546 nm, dichromatic beam splitter FT 580nm, barrier filter LP 590nm) und Grünfluoreszenz (Alexa 488)(Leica: I3; excitation filter BP 450–490 nm, dichromatic mirror 510nm, suppression filter LP 515 nm; Zeiss: excitation filter BP 475 nm, dichromatic beam splitter FT 500 nm, barrier filter LP 530 nm) (Fluoreszenzschnitte) untersucht.

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera erstellt (Pixera Pro 600 ES, Klughammer, Markt Indersdorf, Germany) und mit Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA) so überarbeitet, dass sie dem Originalbild im jeweiligen Mikroskop entsprachen.

Ausgewählte Details von mit ChAT-, GAD-, Syn- und Rezeptor-Antikörpern markierten Fluoreszenzschnitten wurden mit einem Konfokalmikroskop (Leica SP5, Mannheim, Germany) untersucht. Pro Schnitt wurde alle 0,49 µm eine Z-Serie aufgenommen. Mit Hilfe zweier Instrumentierkanäle wurde sowohl die Alexa 488-, als auch die Cy3-Fluoreszenz sequentiell aufgenommen. Die Bildserien wurden unter der Verwendung der ImageJ Software (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012) weiter bearbeitet. Schärfe, Helligkeit und Kontrast wurden so verändert, dass sie dem Bild im Mikroskop entsprachen. Bildtafeln wurden mit der Software CorelDRAW 11 (Corel, Ottawa, ONT, Canada) beschriftet und arrangiert.

### Elektronenmikroskopie

Alle, sowohl die nur kontrastierten Ultradünnschnitte auf Kupfer-Grids, als auch die Immunogold-markierten Ultradünnschnitte auf Nickel-Grids wurden mit Hilfe eines Zeiss Leo Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht und fotografiert.

Helligkeit, Kontrast und Graustufen der Aufnahmen wurden in Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA) so angepasst, dass die Aufnahmen dem, im EM gesehenen Bild entsprachen.

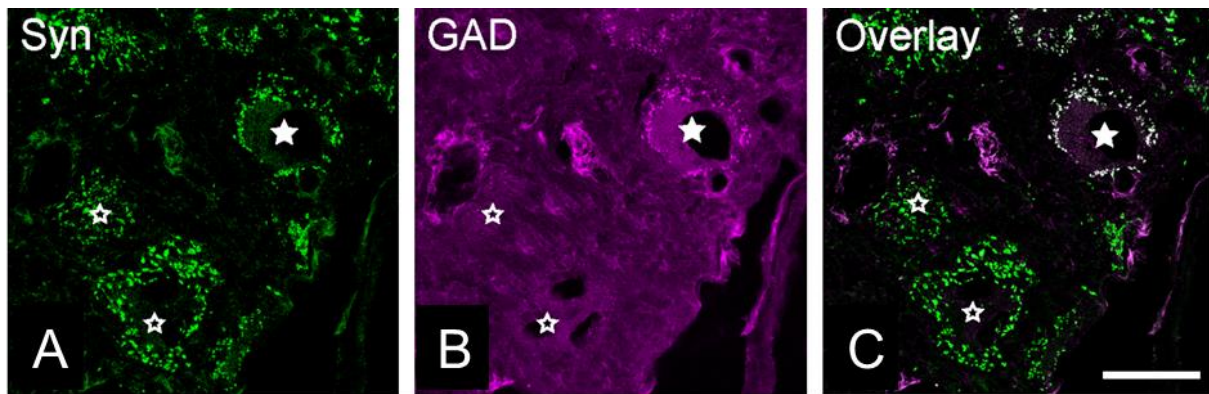
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 CHARAKTERISIERUNG UND FUNKTIONALITÄT DER GABAERGEN EINGÄNGE AUF EINE SUBPOPULATION POSTGANGLIONÄRER CG-NEURONE

##### 3.1.1 GAD-positive Knöpfchen entsprechen Terminalen

Der Beweis, dass es sich bei den, in der Diplomarbeit identifizierten GAD-positiven Knöpfchen um Terminalen handelt, erfolgte mittels einer doppelimmunhistochemischen Fluoreszenzfärbung auf das GABA-synthetisierende Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD) und Synaptophysin (Syn), ein Glycopolypeptid, das in der Membran von synaptischen Vesikeln vorliegt und deswegen häufig als Marker für Terminalen und deren Synapsen verwendet wird (Rehm et al., 1986).

Nahezu alle CG-Neurone waren dicht von grün-fluoreszierenden, Synaptophysin-positiven Terminalen umgeben (Abb. 14A). Diejenigen Neurone, die von magenta-fluoreszierenden, GAD-positiven, knöpfchen-ähnlichen Strukturen umgeben waren (Abb. 14B, Stern gefüllt), waren gleichermaßen von Syn-positiven Terminalen umgeben (Abb. 14A). GAD- und Syn-Immunoreaktivität waren dabei colokalisiert (Abb. 14C, Stern gefüllt). Diese Beobachtung spricht dafür, dass alle GAD-positiven, knöpfchen-ähnlichen Strukturen Terminalen repräsentieren. Darüber hinaus zeigte diese Analyse, dass alle Syn-positiven Terminalen, die mit Neuronen assoziiert sind, welche GAD-positive Knöpfchen empfangen, zugleich GAD-positiv sind. Dies lässt vermuten, dass, sobald ein CG-Neuron von GAD-positiven Terminalen kontaktiert wird, alle diese Eingänge GAD-positiv sind. Der ungefüllte Stern markiert CG-Neurone, welche von Syn-positiven Terminalen umgeben sind, jedoch sind diese Terminalen nicht gleichzeitig GAD-positiv (vgl. Stern gefüllt). Dies deutet darauf hin, dass diese Neurone keine GABAergen, jedoch andere, vermutlich cholinerge, Eingänge bekommen (Barnerssoi et al., 2017).



**Abbildung 14 A-C. Konfokalbilder eines Affen-CG Immunfluoreszenz-markiert auf GAD und Synaptophysin (Syn).** A. Zahlreiche grün-fluoreszierende Synaptophysin (Syn)-positive Terminalen umgeben jedes CG-Neuron. B. Eine Subpopulation von CG-Neuronen erhält einen massiven Input an GAD-positiven, magenta-gefärbten Knöpfchen (Stern gefüllt). Der ungefüllte Stern markiert Neurone ohne GAD-Input. C. Die Überlagerung beider Bilder zeigt, dass sowohl die Syn-Expression (grün), als auch die GAD-Expression (magenta) in den Knöpfchen co-lokalisiert sind (weiß). Das bestätigt, dass die GAD-positiven Knöpfchen Terminalen repräsentieren. Maßstab = 40µm in D (gilt für A–C).

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration modifiziert aus: GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys – A light and electron microscopic study. M. Barnerssoi et al., J Comp Neurol. 2017 May 1;525(7):1517-1531. Fig. 1 © 2017, John Wiley & Sons.

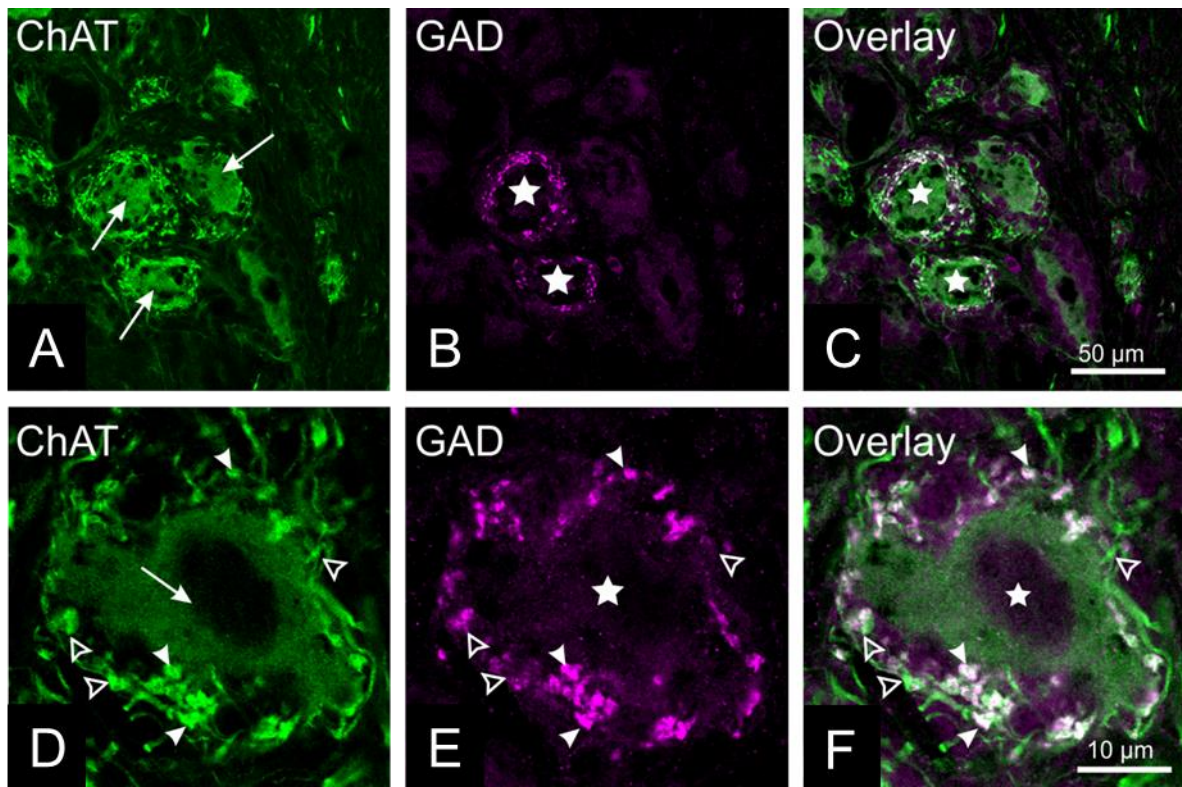
### 3.1.2 ChAT und GAD sind in den CG-Terminalen co-lokalisiert

Eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf GAD und Cholinacetyltransferase (ChAT) sollte dazu dienen, die Co-Lokalisation der beiden Marker in den Terminalen im CG (hier beim Affen) zu überprüfen (Abb. 15A-F). Abbildung 15A zeigt ein Konfokalbild, auf dem cholinerge CG Neurone und die afferenten, ebenso ChAT-positiven Terminalen zu sehen sind (grün, Pfeile). Abbildung 15B zeigt dieselben Neurone, die GAD-negativ sind. Zwei dieser Neurone sind jedoch von GAD-positiven, magenta-fluoreszierenden Terminalen umgeben. Diese Terminalen kontaktieren eine Subpopulation grün-fluoreszierender, ChAT-positiver, jedoch GAD-negativer Somata (Sterne).

Die Überlagerung der beiden Bilder zeigt, dass alle magenta-fluoreszierenden, GAD-positiven Terminalen ebenso grün fluoreszieren und damit ChAT co-exprimieren, aber auch, dass nicht alle ChAT-positiven Terminalen gleichzeitig GAD-positiv sind (Abb. 15C). Ein Beispiel eines solchen Neurons, welches von GAD-/ChAT-positiven Terminalen umgeben ist, wird in einer höheren Vergrößerung in Bild



F gezeigt. Das cholinerge, GAD-negative Neuron ist von cholinergen Terminalen umgeben, die gleichzeitig GAD-positiv sind. Einige wenige sind jedoch ausschließlich cholinerg (ungefüllte Pfeilspitzen). Die Überlagerung der vergrößerten Bilder zeigt noch deutlicher die Co-Expression der beiden Marker (weiß, gefüllte Pfeilspitzen).



**Abbildung 15 A–F. Konfokalmikroskopische Bilder einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung eines Affen-CG gefärbt auf ChAT (grün) und GAD (magenta).**

C und F zeigen die Überlagerung von E und F und H und I. Die Somata aller CG-Neurone zeigen ChAT-Immunreaktivität (A und D, Pfeile). Keines der Somata ist GAD-positiv (B und E). Eine höhere Vergrößerung eines beispielhaften CG-Neurons (D-F) zeigt, dass alle GAD-positiven Terminalen (E, ausgefüllte Pfeilspitzen) gleichzeitig ChAT-positiv sind (F, weiß, ausgefüllte Pfeilspitzen). Gleichzeitig sind einige wenige ChAT-positive Endigungen nicht GAD-positiv (D-F, ungefüllte Pfeilspitzen).

Maßstab: 50µm in C (gilt für A-C), 10µm in F (gilt für D-F).

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration modifiziert aus: GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys – A light and electron microscopic study. M. Barnerssoi et al., J Comp Neurol. 2017 May 1;525(7):1517-1531. Fig. 1 © 2017, John Wiley & Sons.

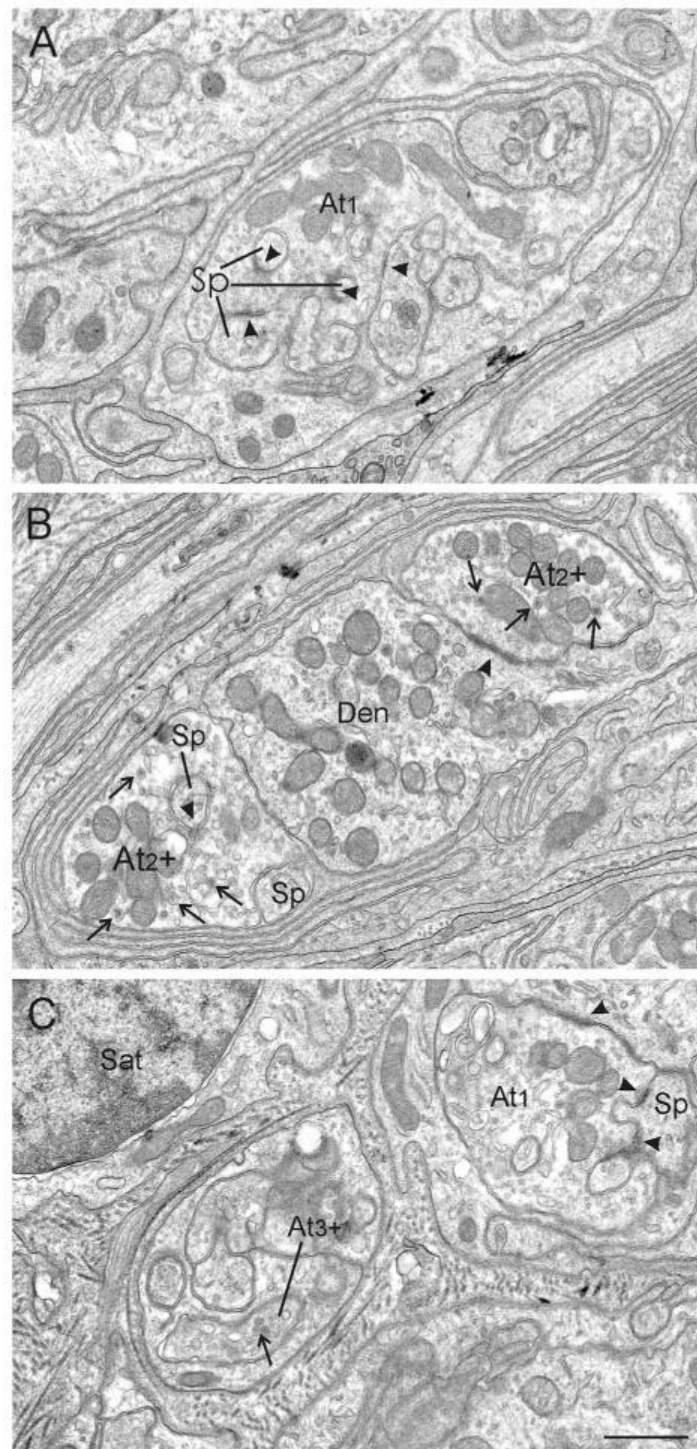


### 3.1.3 Ultrastrukturelle Analyse der Terminalen im CG

Nachdem lichtmikroskopisch gezeigt wurde, dass GAD-positive, knöpfchenähnliche Strukturen, welche um CG-Neurone herum lokalisiert sind, Terminalen sind, und ChAT und GAD in diesen co-lokalisiert sind, wurden die charakteristischen ultrastrukturellen Eigenschaften dieser Terminalen mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Die Terminalen bzw. Synapsen wurden durch, für Synapsen bekannte und kennzeichnende Merkmale, wie das Vorhandensein beschriebener prä- und postsynaptischer Verdichtungen um den synaptischen Spalt herum und die Ansammlung von Vesikeln im präsynaptischen, neuronalen Profil identifiziert. Die Analyse der Ultradünnschnitte ergab, dass die meisten synaptischen Kontakte im perisomatischen Neuropil, welches jedes postganglionäre Motoneuron-Soma direkt umgibt, lokalisiert waren. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Lichtmikroskopie. Zahlreiche neuronale Profile, welche Vesikel beinhalteten, kontaktierten Dendriten und/oder Dornfortsätze (engl. „spines“) innerhalb des Neuropils. Sehr selten wurden Somata kontaktiert (nicht gezeigt). Die neuronalen Profile zeigten typische Merkmale von Nervenendigungen, wie klare und „dense-core“ Vesikel (Vesikel mit dichtem Kernmaterial), Mitochondrien und synaptische Verdichtungen. In der aktuellen CG Studie konnten drei unterschiedliche Typen von Terminalen unterschieden werden.

Der am häufigsten auftretende Synapsentyp wurde als Axon-Terminal-Typ 1 (At<sub>1</sub>) bezeichnet (Abb. 16A). Diese Terminalen enthalten klare, sphärische Vesikel, wobei dense-core Vesikel entweder sehr selten vorkommen, oder komplett abwesend sind. Die synaptischen Kontakte des At<sub>1</sub>-Typs weisen deutlich asymmetrische, synaptische Verdichtungen auf (Pfeilspitzen). Die Typ 2 - Axon Terminalen (At<sub>2</sub>; Abb. 16B) sehen den Typ 1 - Axon Terminalen sehr ähnlich, allerdings enthalten sie deutlich mehr dense-core Vesikel mit dichtem Kernmaterial (Pfeile) und die anderen Vesikel erscheinen ein bisschen mehr pleomorph, als die Vesikel im At<sub>1</sub>-Typ, die im direkten Vergleich eine eindeutig sphärische, runde Form haben. Zusätzlich wirken die synaptischen Verdichtungen (Pfeilspitzen) um den synaptischen Spalt nicht ganz so asymmetrisch, wie At<sub>1</sub> Kontakte. Ein dritter Axon-Terminal-Typ (At<sub>3</sub>; Abb. 16C) konnte nur selten beobachtet werden. Dieser Typ unterscheidet sich eindeutig von At<sub>1</sub> und At<sub>2</sub>, auf Grund der Häufigkeit der vorkommenden dense-core Vesikel (Pfeil), welche den vorherrschenden Vesikeltyp

darstellten. In den untersuchten At<sub>3</sub> Terminalen konnten keine synaptischen Verdichtungen identifiziert werden (Barnerssoi et al., 2017).



**Abbildung 16.** Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen drei unterschiedliche Terminaltypen, die Dendriten (Den) oder Dornen („spines“ (Sp)) im perisomatischen Neuropil kontaktieren.

A. Der Axon-Terminalentyp 1 (At<sub>1</sub>) ist der am häufigsten vorkommende Terminalentyp im Affen-CG. Dieser Typ besitzt/zeigt klare, runde (kugelförmige) Vesikel und keine, oder sehr wenige Vesikel mit dichtem Kernmaterial (dense-core Vesikel). Die synaptischen Kontakte sind eindeutig asymmetrisch

(Pfeilspitzen). B. Der Axon-Terminaltyp 2 (At<sub>2</sub>) besitzt etwas pleomorphe Vesikel und zudem mehr Vesikel mit dichtem Kernmaterial (Pfeile). Ihre synaptischen Kontakte erscheinen etwas weniger asymmetrisch als beim At<sub>1</sub> Typ (Pfeilspitzen). C. Der Axon Terminaltyp 3 (At<sub>3</sub>) kommt sehr selten vor und besticht durch die große Anzahl an dense-core Vesikeln, welche den prominenten Vesikeltyp in diesen Terminalen darstellen (Pfeile). Synaptische Kontakte wurden in den untersuchten Proben nicht gefunden.

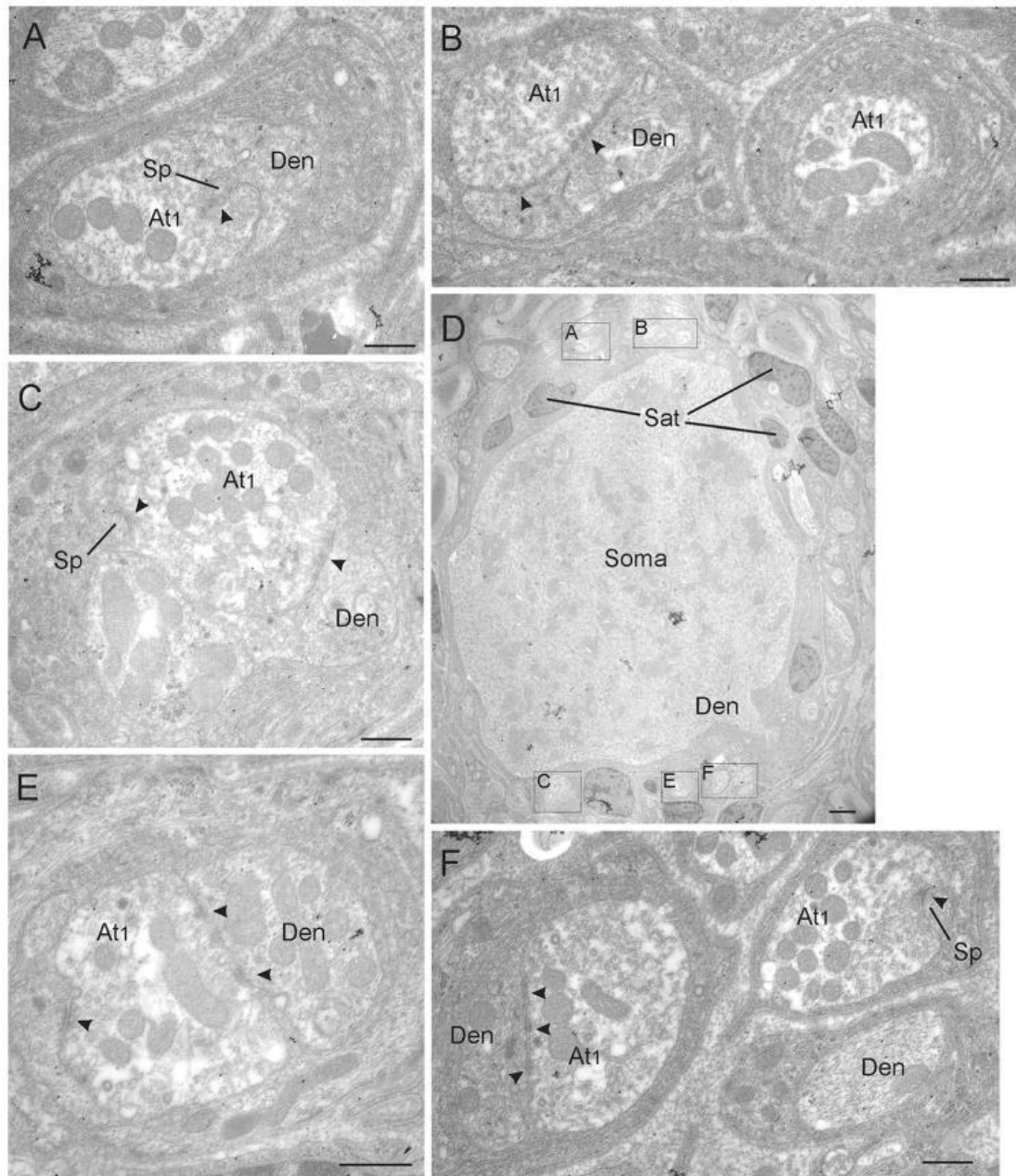
Abkürzungen: At<sub>1</sub> = Axon Terminaltyp 1, At<sub>2</sub> = Axon-Terminaltyp 2, At<sub>3</sub> = Axon-Terminaltyp 3, Den = Dendrit, Sp = Spine, Sat = Satellitenzelle. Maßstab = 0,8µm in C (gilt für A-C).

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration modifiziert aus: GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys – A light and electron microscopic study. M. Barnerssoi et al., J Comp Neurol. 2017 May 1;525(7):1517-1531. Fig. 2 © 2017, John Wiley & Sons.

### 3.1.4 GABA-positive Terminalen entsprechen dem At<sub>2</sub>-Typ

Durch die Verwendung einer „postembedding“ Immunogoldfärbung auf GABA, wurde untersucht, ob die GABA-Expression auf einen der drei verschiedenen Terminaltypen beschränkt ist.

Basierend auf den lichtmikroskopischen Daten, konzentrierten sich die Untersuchungen auf das perisomatische Neuropil. Wie schon unter dem Lichtmikroskop gesehen, wurden auch beim Elektronenmikroskop die Somata der CG Neurone entweder ausschließlich von GABA-negativen, oder ausschließlich von GABA-positiven Terminalen kontaktiert, wobei die Terminalen an deren Membran, oder zumeist im perisomatischen Neuropil lokalisiert waren. Abbildung 17 zeigt ein typisches CG Neuron, das ausschließlich von GABA-negativen Terminalen umgeben ist, welche ausnahmslos Merkmale des At<sub>1</sub>-Terminaltyps mit z. B. deutlich asymmetrischer synaptischer Verdichtung aufweisen. Das Hintergrundlevel an Goldpartikeln war in diesem Gewebe zwar vorhanden, jedoch wurde keine der At<sub>1</sub> Terminalen von einer ausreichenden Anzahl an Goldpartikeln überlagert, womit sie als GABA-positiv gewertet werden hätte können.



**Abbildung 17. Ultrastruktur von Neuronen mit At<sub>1</sub>-Eingängen.**

Elektronenmikroskopische Bilder GABA-negativer Terminals zu sehen in einem CG Ultradünnschnitt, welcher mittels Immunogold auf GABA markiert wurde. Das niedrig vergrößerte Elektronenmikroskopbild eines typischen Affen CG-Neurons (D) soll die Lokalisation der hoch vergrößerten Beispiele von At<sub>1</sub>-Terminalen (Boxen A-F außer D) im perisomatischen Neuropil dieses Neurons zeigen. Pfeilspitzen kennzeichnen synaptische Kontakte.

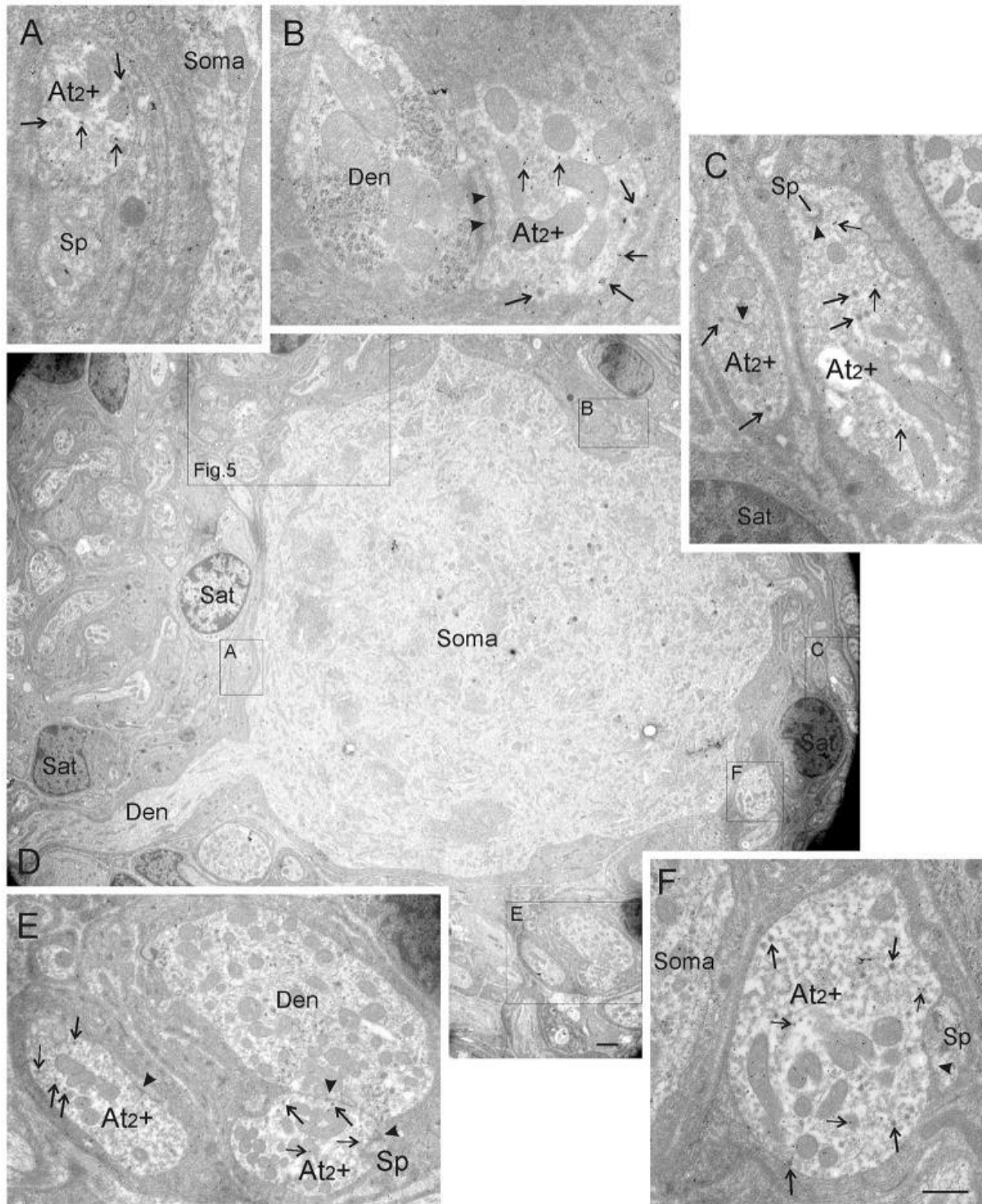
Beachte, dass alle At<sub>1</sub> Terminals GABA-negativ sind (A-F).

Abkürzungen: At<sub>1</sub> = Axon-Terminaltyp 1, Den = Dendrit, Sat = Satellitenzelle, Sp = Spine, Maßstab = 0,5 µm in A-C, E, F; 2,0 µm in D. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration modifiziert aus: GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys – A light and electron microscopic study. M. Barnerssoi et al., J Comp Neurol. 2017 May 1;525(7):1517-1531. Fig. 3 © 2017, John Wiley & Sons.

In Abbildung 18D ist eine kleine Vergrößerung einer Mikrofotografie eines CG Neuron abgebildet, das Eingänge von zahlreichen GABA-Immunogold-markierten Terminalen erhält. In diesem Fall war die Anzahl der Goldpartikel, die jede der Terminalen im perisomatischen Neuropil überdeckten, deutlich über dem Hintergrundlevel. Diese Terminalen waren alle vom At<sub>2</sub> Typ, charakterisiert durch ihre zahlreichen dense-core Vesikel, wie auch ihre synaptischen Verdichtungen, die weniger asymmetrisch, als At<sub>1</sub> Typ Verdichtungen erscheinen. Um diese Terminalen im Detail zu demonstrieren, zeigt die Abbildung 19A eine höhere Vergrößerung derjenigen Region, die in dem Rechteck in Abbildung 18D zu sehen ist. Die höhere Vergrößerung der Kontakte, die sich in dieser Region befinden, erlaubt eine nähere Inspektion von fünf GABA-positiven Terminalen, was durch die vorhandenen Goldpartikel angezeigt wird.

Dass GABA Immunogold-Partikel außerdem präferiert an Mitochondrien binden, wie hier beobachtet, wurde ebenfalls schon in anderen Studien gezeigt (Beaulieu and Somogyi, 1991). Man beachte, dass die Immunogold-markierten Terminalen eine beträchtliche Anzahl an dense-core Vesikel enthalten und somit als At<sub>2</sub>+ klassifiziert wurden. Um zu verifizieren, dass die Immunogold-Markierung einen beständigen Befund darstellte, wurden dieselben Terminalen in fortlaufenden Ultradünnschnitten untersucht. Die Abbildungen 19C und 19F zeigen EM-Aufnahmen der gleichen Terminale in aufeinander folgenden Ultradünnschnitten, was anhand der angeschnittenen Mitochondrien in beiden Schnitten nachvollzogen werden kann. In beiden Bildern ist die Terminale dicht mit Immunogold-Partikeln (dünne Pfeile) markiert, was dafür spricht, dass die Immunogold-Färbung hoch spezifisch und damit verlässlich war.



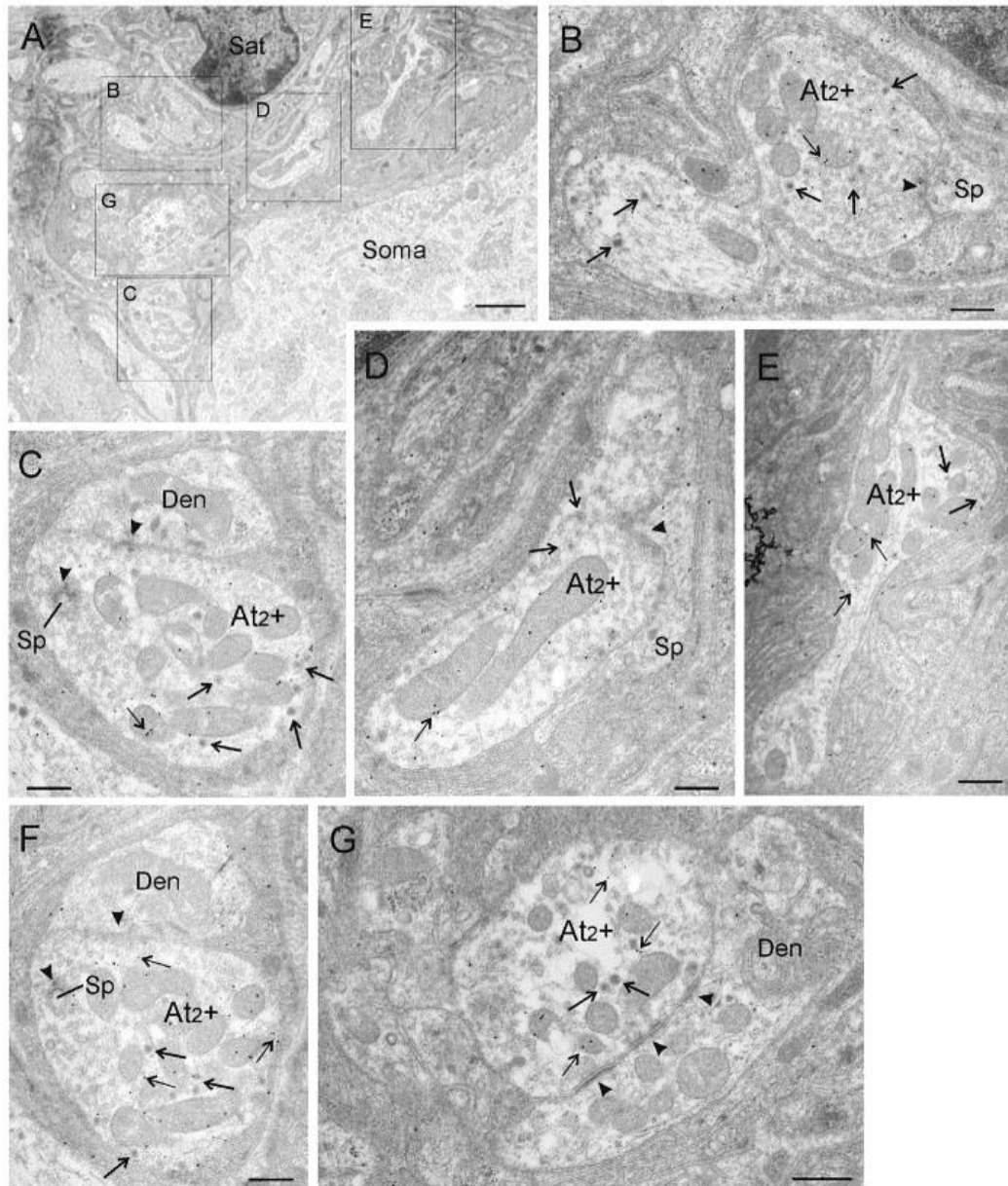


**Abbildung 18. Ultrastruktur von CG-Neuronen, welche von GABA-Immunogold-markierten At<sub>2</sub> Terminalen kontaktiert werden.** D zeigt eine niedrig vergrößerte Übersicht eines typischen CG-Neurons, in dessen perisomatischem Neuropil ausschließlich GABA-positive Terminalen zu finden sind (Kästchen A-F ohne D). Dass diese Terminalen GABA-positiv sind, wird durch die Präsenz von, die Terminalen überlagernden Goldpartikel (dünne Pfeile) indiziert. Auf Grund der vordefinierten Kriterien (wie beispielsweise die Anzahl der dense-core Vesikel (Pfeile) oder die weniger asymmetrischen Membranverdichtungen am synaptischen Spalt (Pfeilspitzen)) wurden sie als Terminalen des At<sub>2</sub>-Typs klassifiziert (At<sub>2</sub>+, Boxen A-F ohne D). Detaillierte Bilder der Immunogold-

markierten At<sub>2</sub>-Terminalen (At<sub>2</sub>+, Boxen in D) sind in A, B, C, E und F gezeigt. Eine Vergrößerung des in 17D markierten Areals ist in Abbildung 18A (Fig. 5) gezeigt.

Abkürzungen: At<sub>2</sub>+ = Axon-Terminalentyp 2 positiv Immunogold-markiert auf GABA, Den = Dendrit, Sat = Satellitenzelle, Sp = Spine. Maßstab = 0,5 µm in A-C, E-F; 2,0 µm in D.

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration modifiziert aus: GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys – A light and electron microscopic study. M. Barnerssoi et al., J Comp Neurol. 2017 May 1;525(7):1517-1531. Fig. 4 © 2017, John Wiley & Sons.



**Abbildung 19. Ultrastrukturelle Details GABA-positiver Terminalen.**

C und F zeigen dieselbe Terminale in aufeinanderfolgenden Serienschritten. A zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des in Abbildung 4D mittels eines Rahmens markierten Areals. Die Boxen (B–G) zeigen weitere GABA-positive At2-Terminals (At2+), die dasselbe CG-Neuron wie in Abbildung 4 kontaktieren.

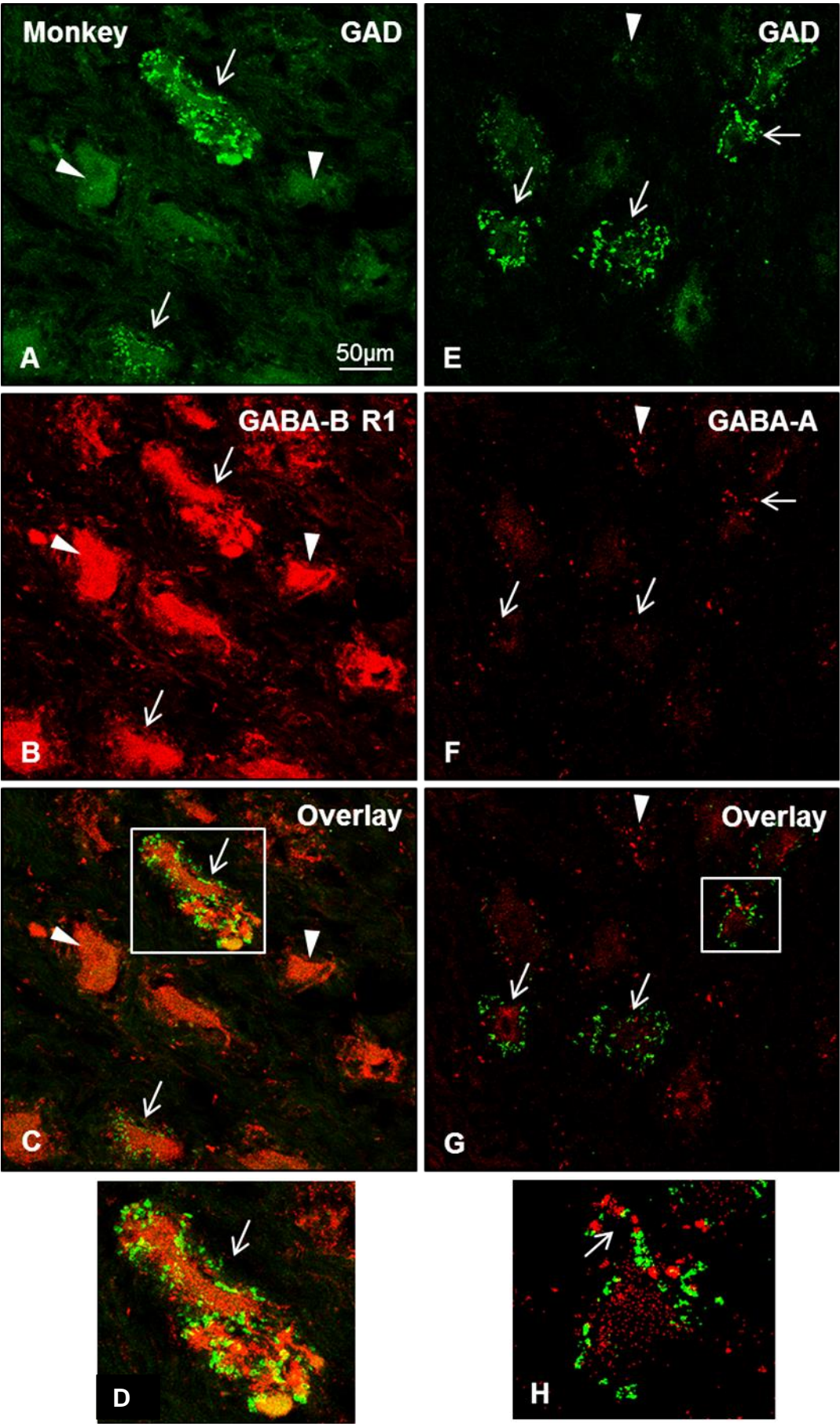
In B–G sind die Terminalen in den Boxen aus A in einer höheren Vergrößerung gezeigt. Mehrere Immunogold-Partikel (dünne Pfeile) überlagern jede At2-Terminals und lassen dadurch darauf schließen, dass At2-Terminals GABA-positiv sind.

Abkürzungen: At<sub>2</sub>+ = Axon-Terminaltyp 2 positiv Immunogold-markiert auf GABA, Den = Dendrit, Sat = Satellitenzelle, Sp = Spine. Maßstab = 2,0 µm in A; 0,5 µm in B–G. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons: Illustration modifiziert aus: GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys – A light and electron microscopic study. M. Barnerssoi et al., J Comp Neurol. 2017 May 1;525(7):1517-1531. Fig. 5 © 2017, John Wiley & Sons.



### 3.1.5 GABA-A und GABA-B 1 Rezeptoren werden in allen Affen CG-Neuronen exprimiert

Um die Funktionalität von GABA im CG zu bestätigen, wurden mehrere Affen-CG (*M. mulatta* oder *fascicularis*) auf das Vorkommen von GABA-Rezeptoren hin untersucht. Die doppelimmunhistochemischen Färbungen auf GAD und den GABA-B Rezeptor 1 (GABA-B R), sowie GAD und den GABA-A Rezeptor zeigten, dass alle CG-Neurone sowohl den GABA-A Rezeptor (Abb. 20F, rot), als auch den GABA-B 1 Rezeptor (Abb. 20B, rot) exprimieren, nicht nur die Subpopulation an CG-Neuronen, die von GAD-positiven Terminalen kontaktiert wird (Abb. 20A+E, Pfeile). Die Überlagerung der Konfokalaufnahmen zeigt, dass die GAD-positiven Terminalen sehr eng mit den Rezeptoren assoziiert sind, und diese erwartungsgemäß nicht überlagern, da beide Moleküle in unterschiedlichen Kompartimenten (präsynaptisch, postsynaptisch) exprimiert werden (Abb. 20C, G). D und H zeigen jeweils eine Vergrößerung, der in C und G durch Rechtecke markierten Bereiche. Hier sieht man besonders deutlich die Lokalisation von GAD gegenüber dem GABA-A Rezeptor (H) bzw. GABA-B R1 (D).



**Abbildung 20. Konfokalbilder von CG-Gefrierschnitten eines Affen, markiert mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung auf GAD und GABA-A Rezeptor (GABA-A, E-H) oder GAD und GABA-B Rezeptor 1 (GABA-B R1, A-D).** Alle CG-Neurone zeigen eine Immunreaktivität für GABA-A (rot, F) bzw. GABA-B R1 (rot, B). Eine Subpopulation aller CG-Neurone wird von GAD-positiven Terminalen kontaktiert (grün, A+E). Die Überlagerung zeigt, dass die GABA-Rezeptoren eng mit den GAD-positiven Terminalen assoziiert sind, diese sich jedoch nicht überlagern (C, D, G, H). Der Maßstab in A = 50µm gilt für A-C und für E-G.

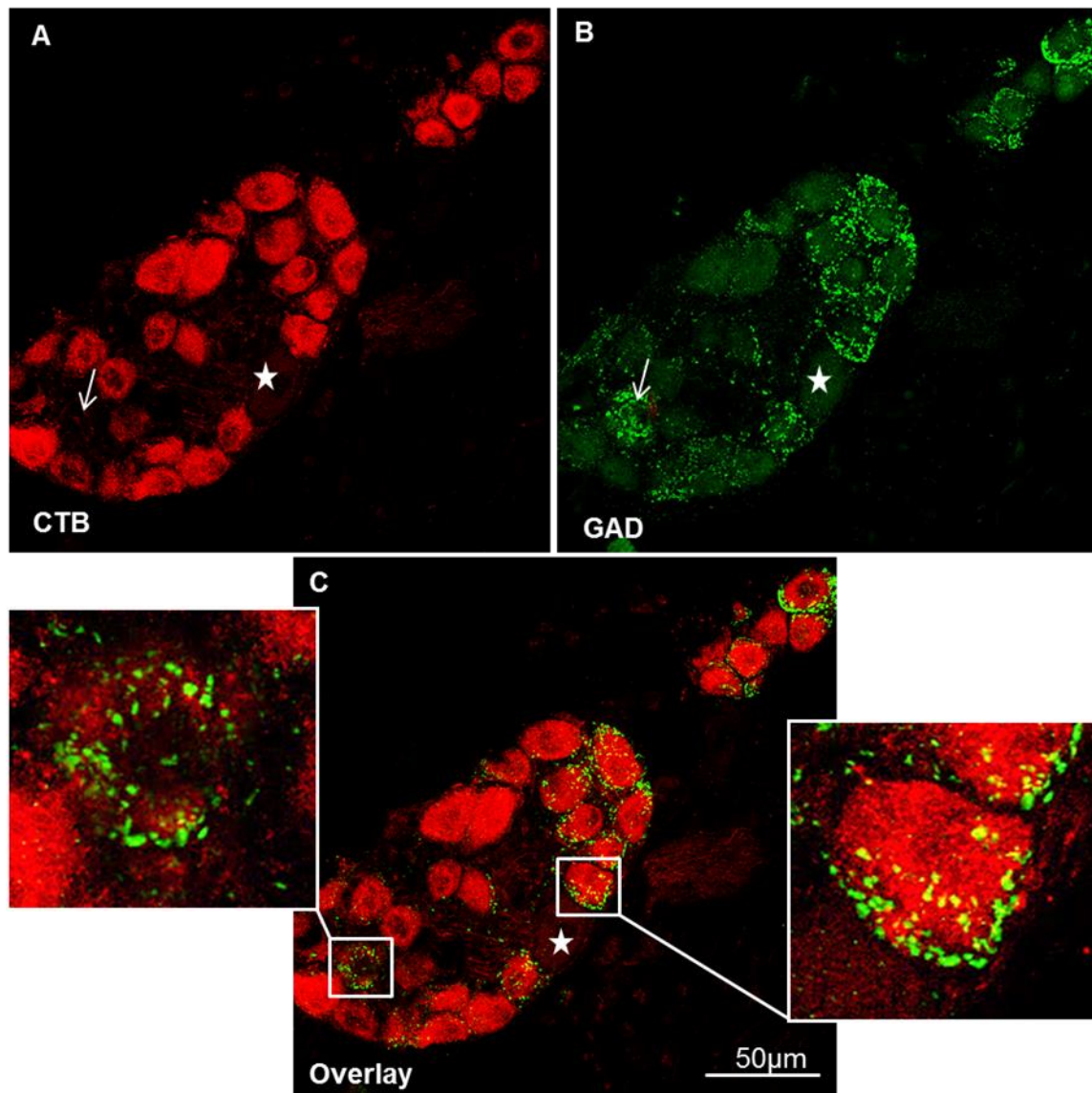
## 3.2 FUNKTION VON GABA IM GANGLION CILIARE

### 3.2.1 Identifizierung funktionell unterschiedlicher, postganglionärer Neurone im CG

#### 3.2.1.1 Identifizierung von Pupillenneuronen - Tracerinjektion in die vordere Augenkammer bei der Ratte (R35, R40, R44)

*Nach einer vorderen Augenkammerinjektion sind GABAerge Terminalen mit Tracermarkierten und unmarkierten postganglionären Neuronen im Ganglion ciliare assoziiert*

Nach einer Tract-Tracing Injektion mit Choleratoxin Untereinheit B (CTB) oder Weizenkeimagglutinin (WGA) in die vordere Augenkammer von drei Ratten (R35, R40, R44) sollten eher die postganglionären Neurone des M. sphincter pupillae markiert werden. Die anschließende immunhistochemische Doppelfärbung der CG auf den Tracer (hier: CTB, Abb. 21A, rot) und GAD (Abb. 21B, grün), zeigt, dass bis auf einige wenige (A, Stern, Pfeil), alle CG-Neuron Somata CTB-positiv sind (rot). Eine Subpopulation aller CG-Neurone ist von GAD-positiven Endigungen umgeben (B, grün). Die Überlagerung (Overlay, C) der beiden Bilder zeigt, dass sowohl Tracermarkierte (rot), wie auch unmarkierte CG-Neurone GABAerge Eingänge erhalten (siehe Kästchen).

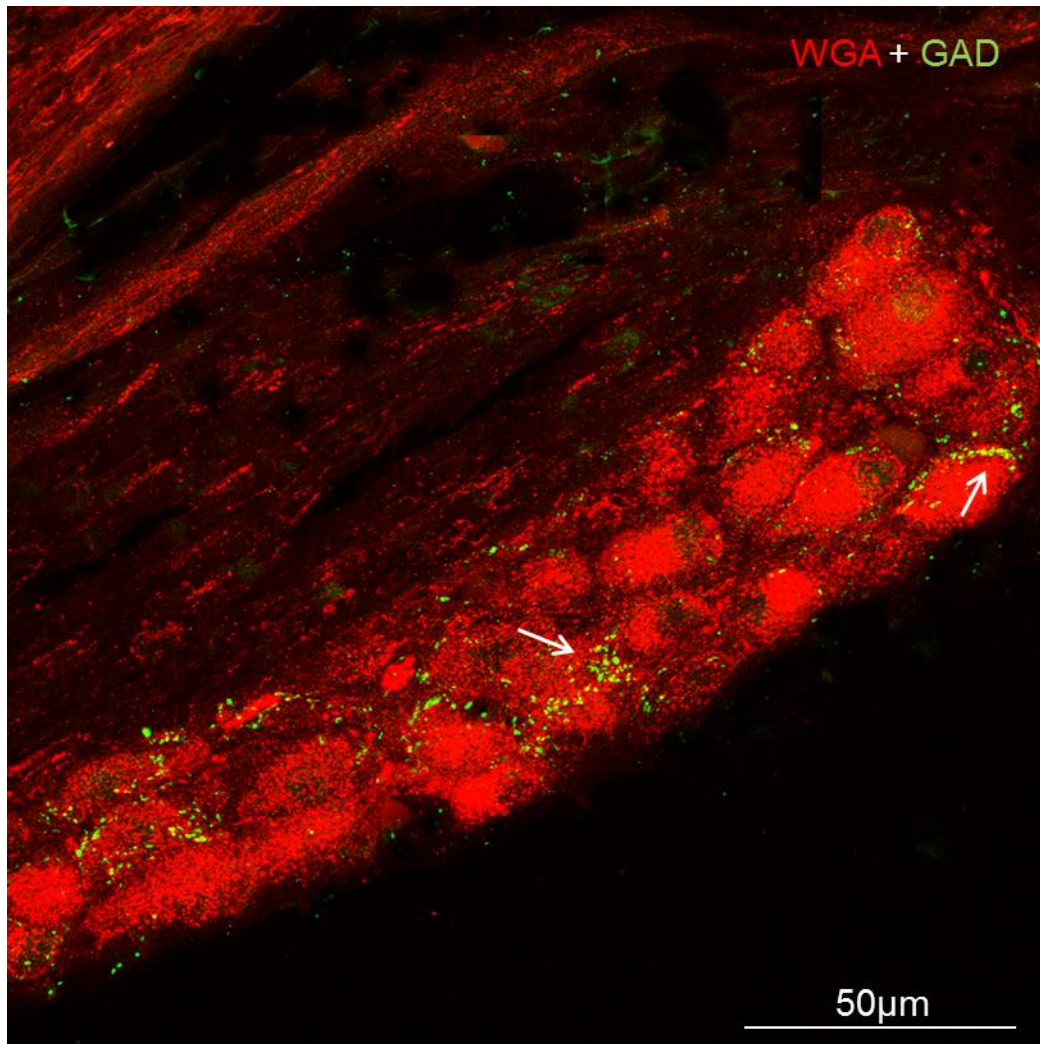


**Abbildung 21.** Konfokalbilder eines CG-Gefrierschnittes einer Ratte nach einer CTB-Injektion in die vordere linke Augenkammer immunhistochemisch gefärbt auf CTB (A, rot) und GAD (B, grün). C zeigt die Überlagerung von A und B. GAD-positive Terminalen kontaktieren Tracer-positive und Tracer-negative CG-Neurone (siehe Vergrößerungen). Einige Neurone zeigen keinerlei Markierung (siehe Sterne). Die Kästchen zeigen ein unmarkiertes und ein Tracer-markiertes Neuron und deren GAD-positive Kontakte in der Vergrößerung. Der Stern markiert eine Zelle, die CTB-negativ ist und die zudem keinen GABAergen Input erhält. Der Pfeil in A und B markiert ein CG-Neuron, das CTB-negativ ist, jedoch von GAD-positiven Terminalen umgeben ist. Der Maßstab in C gilt auch für A und B.

### **3.2.1.2 Identifizierung von Akkommodationsneuronen - Tracerinjektion in die hintere Augenkammer bei der Ratte (R36)**

Die Tract-tracing Injektion mit Weizenkeimagglutinin (WGA) in die hintere Augenkammer einer Ratte sollte vornehmlich die postganglionären Neurone des M. ciliaris markieren. Allerdings zeigte die anschließende immunhistochemische Doppelfärbung des zugehörigen CG auf den Tracer (hier: WGA, Abb. 22, rot) und GAD (Abb. 22, grün), dass optisch alle CG-Neuron Somata den Tracer WGA enthalten (rot). Eine Subpopulation aller CG-Neurone ist von GAD-positiven Endigungen umgeben (grün) (Abb. 22).





**Abbildung 22.** Konfokalbild eines CG-Gefrierschnittes einer Ratte nach einer WGA-Injektion in die hintere linke Augenkammer, immunhistochemisch gefärbt auf WGA (rot) und GAD (grün). GAD-positive Terminalen kontaktieren Tracer-positive CG-Neurone (Pfeile). Beachte: Es scheinen virtuell alle CG-Neuronsomata Tracer-markiert zu sein.

### **3.2.1.3 Identifizierung von Akkommodationsneuronen - Tracerinjektion in den M. ciliaris beim Makaken (M. nemestrina, Z15001)**

*Akkommodations- und Pupillenneurone erhalten im Affen-CG einen GABAergen Eingang*

Nach einer Tract-tracing Injektion mit WGA in den rechten M. ciliaris eines Affen (*M. nemestrina*, Z15001) und einer anschließenden immunhistochemischen Doppelfärbung des rechten CG auf den Tracer (WGA, braun) und GAD (schwarz), finden sich im Ganglion ciliare eindeutig Tracer-positive, wie auch Tracer-negative Neurone (Abb. 23). Es wird vermutet, dass Tracer-negative Neurone Pupillenneurone repräsentieren, während Tracer-positive Neurone vermutlich Akkommodationsneurone sind. Bei der näheren Untersuchung fiel auf, dass sowohl eine Subpopulation Tracer-markierter, als auch –unmarkierter Neurone von GAD-positiven Terminalen kontaktiert wird. Es finden sich Tracer-markierte Neurone mit GAD-positivem Eingang (Pfeilspitzen) und Tracer-negative Neurone, die von GAD-positiven Endigungen kontaktiert werden (Pfeil).



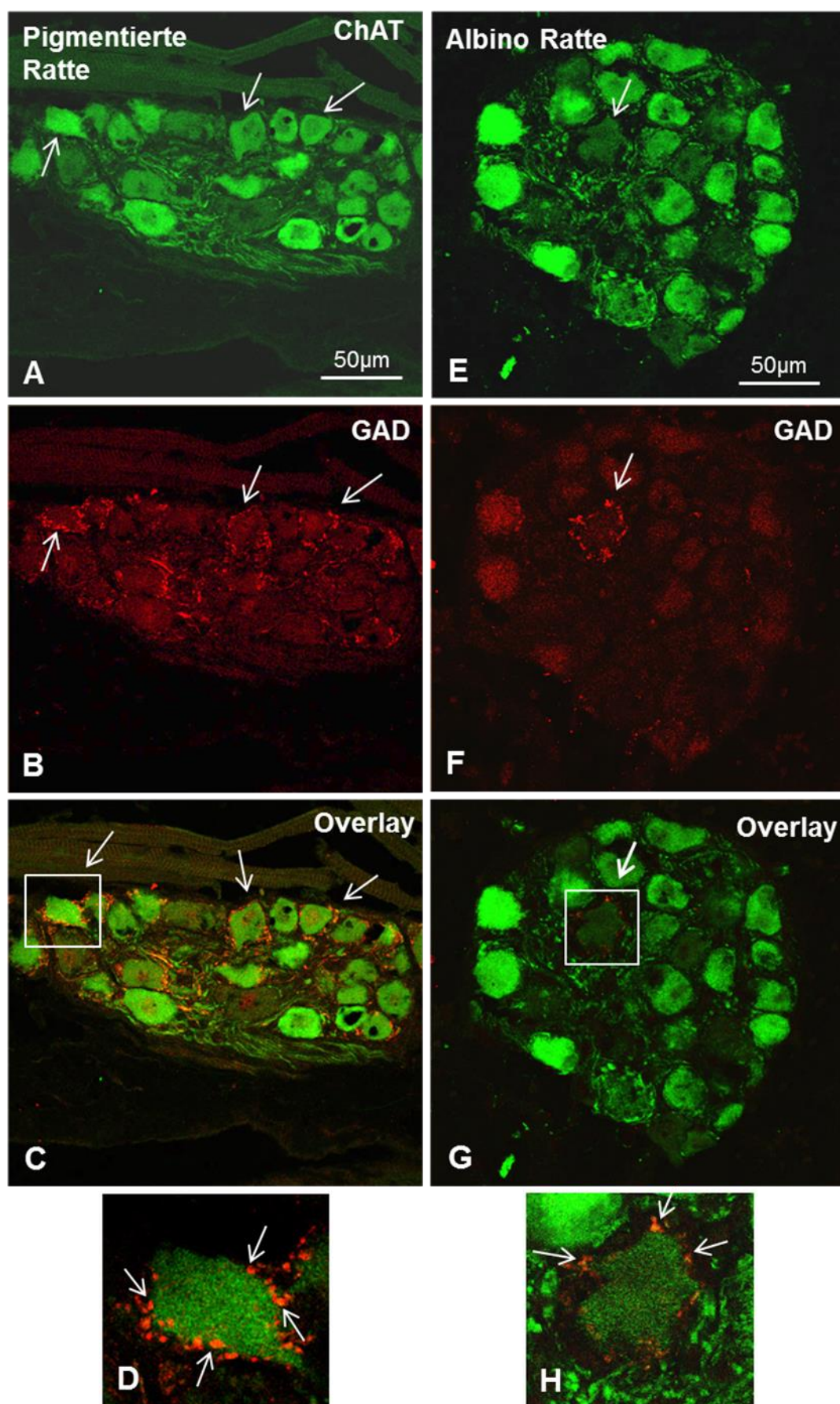


**Abbildung 23.** Doppelimmunhistochemische Färbung eines Affen CG Gefrierschnittes (*M. nemestrina*) auf WGA (braun) und GAD (schwarz) nach Tract-tracer Injektion mit WGA in den rechten *M. ciliaris*. Sowohl einige Tracer-positive (Pfeilspitzen), als auch einige Tracer-negative Neurone (Pfeil) werden von GAD-positiven Endigungen kontaktiert. Der Stern markiert ein Neuron, welches keinerlei Immunreaktivität zeigt.

### 3.2.2 „Wildtyp vs. Albino“

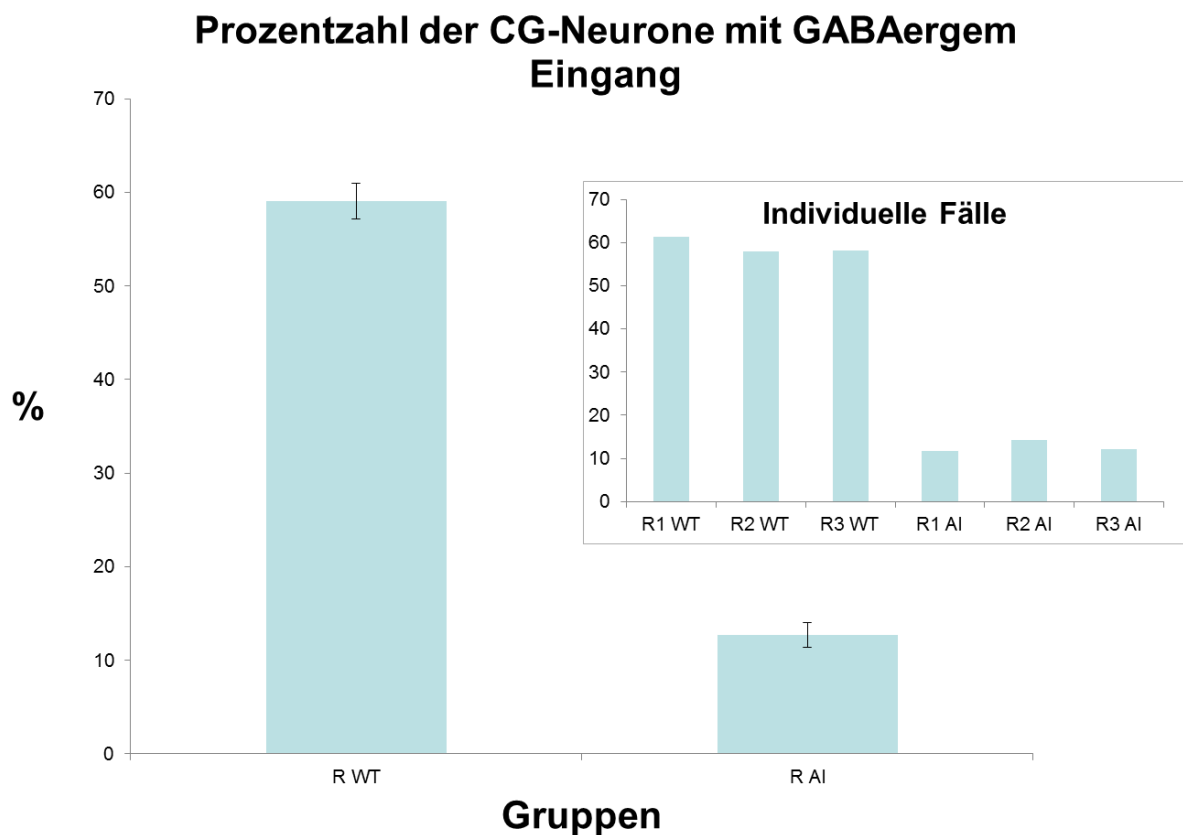
*Prozentual gesehen erhalten mehr postganglionäre Neurone einen GABAergen Eingang im CG von pigmentierten Ratten (~60%) als bei der Albino-Ratte (~13%)*

Nach einer immunhistochemischen Doppelmarkierung auf ChAT und GAD weisen sowohl im CG der pigmentierten Ratte (Wildtyp), als auch im CG der Albino-Ratte optisch alle Neurone eine starke bis schwache ChAT-Immunreaktivität auf (Abb. 24A+E, grün). In beiden Fällen ist keines der Neurone GAD-positiv, jedoch sind GAD-positive Endigungen präsent (Abb. 24B+F, rot). Im Overlay ist eindeutig zu sehen, dass in beiden Fällen eine Subpopulation der ChAT-positiven Neurone von den GAD-positiven Endigungen kontaktiert wird (Abb. 24C+G, Pfeile), wobei deutlich sichtbar ist, dass bei der pigmentierten Ratte mehr CG-Neurone einen GABAergen Eingang erhalten, als beim Albino (vgl. Abb. 24B+F/ C+G). Die statistische Auswertung (siehe Abbildung 25) ergab, dass bei der pigmentierten Ratte im Durchschnitt 60% aller CG-Neurone eng mit GAD-positiven Terminalen assoziiert sind, während es beim Albino nur etwa ~13% der CG-Neurone sind.



**Abbildung 24. ChAT- (A+E, grün) and GAD- (B+F, rot) Färbung von CG-Schnitten einer pigmentierten Ratte (A-D) und einer Albino Ratte (E-H).**

C und G zeigen jeweils die Überlagerung (Overlay) von A und B bzw. von E und F. GAD-positive Terminalen, die mit ChAT-positiven, postganglionären CG Neuronen assoziiert sind, sind mit Pfeilen markiert. D und H zeigen jeweils eine Vergrößerung der in C und G umrandeten Bereiche/ Areale, um die Massivität des GABAergen Eingangs auf postganglionäre Neurone im Wildtyp-CG (D) und im Albino-CG (H) zu demonstrieren (Pfeile). Der Maßstab in A = 50µm gilt für A-C. Der Maßstab in E = 50µm gilt für E-G.



**Abbildung 25. Die Abbildung zeigt die Auswertung der einzelnen Wildtyp- (WT) und Albinofälle (AI).**

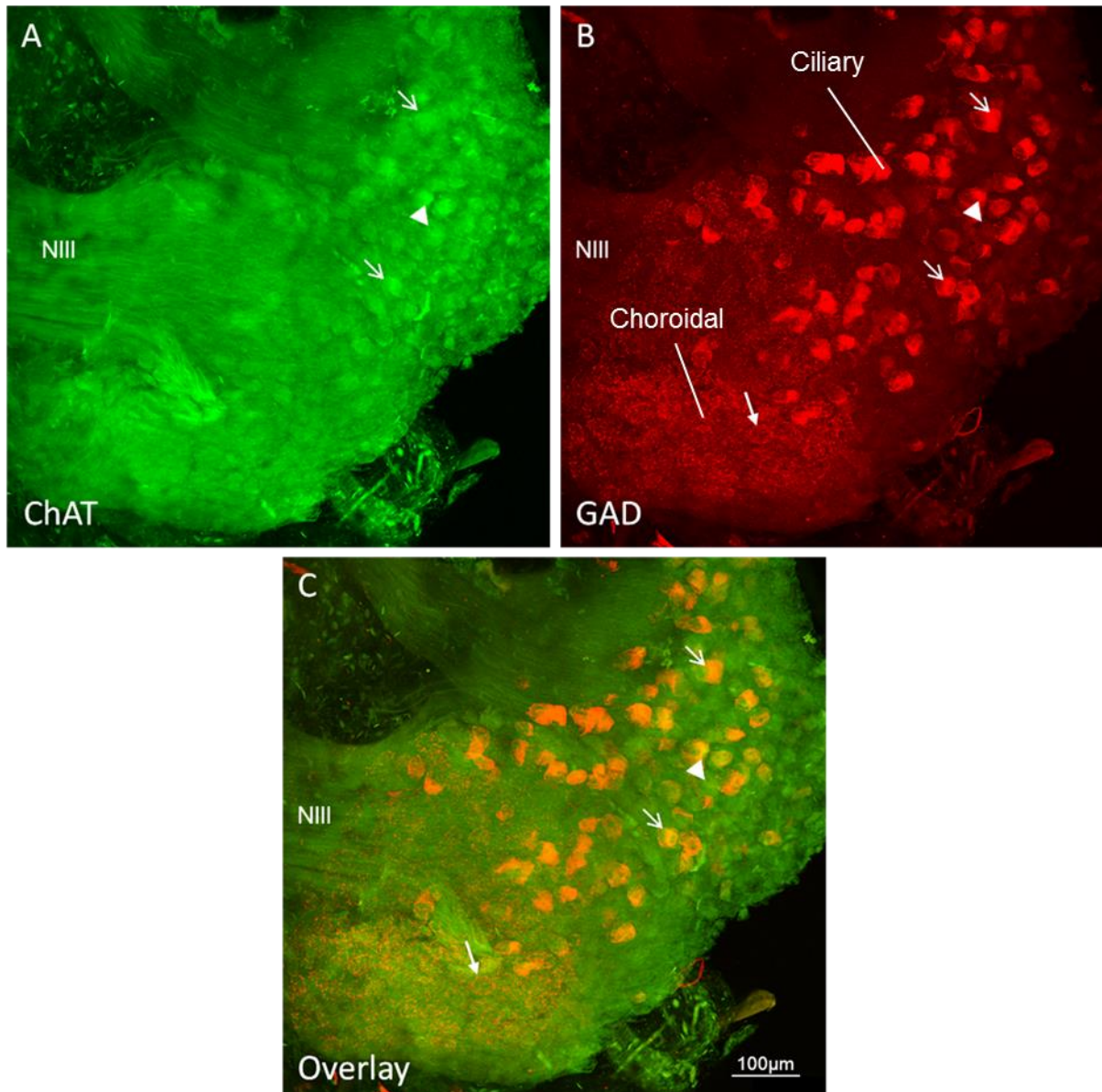
Prozentual erhalten beim Wildtyp ~60% aller CG-Neurone einen GABAergen Input (R WT), während beim Albino (R AI) nur ~13% aller CG-Neurone von GAD-positiven Terminalen kontaktiert werden.

### 3.2.3 Bei der Taube erhalten Ciliar- und Choroidneurone GABAerge Eingänge

Die doppelimmunhistochemische Färbung eines Kompletpräparats („Wholemount“) auf ChAT (zur Identifikation der postganglionären CG-Neurone) und GAD (zur Darstellung des GABAergen Inputs) eines Tauben-CG zeigt eine positive ChAT-Immunreaktivität für augenscheinlich alle CG-Neuron-Somata (Abb. 26A, grün). Keines der Somata ist dagegen GAD-positiv (Abb. 26B). Beachte, dass die großen roten Strukturen keine Neurone, sondern Endigungen darstellen! Im Vogel-CG befinden sich neben den Pupillen- und Akkommodationsneuronen (zusammengefasst als Ciliarneurone) außerdem Neurone, die die Aderhaut innervieren (Choroidneurone). Diese werden von Knöpfchen-ähnlichen Terminalen kontaktiert, Ciliarneurone hingegen von einer einzigen Kappen-ähnlichen Endigung (dünne Pfeile). In B ist sichtbar, dass sowohl Knöpfchen- (Pfeil mit ausgefüllter Spitze, rot), als auch Kappen-ähnliche Endigungen (dünne Pfeile) GAD-positiv sind. Somit erhalten beide funktionellen CG-Neuronen-Subgruppen einen GABAergen Eingang. Die Überlagerung (C) zeigt deutlich, dass nur jeweils eine Subpopulation der jeweiligen Neuronengruppen kontaktiert wird. Die Pfeilspitze in C zeigt ein ChAT-positives CG-Neuron (vermutlich ein Ciliarneuron), welches nicht von einer GAD-positiven Kappe umgeben ist, sondern vermutlich andere Eingänge erhält.

Auffällig ist außerdem die jeweilige Lage von Ciliar- und Choroidneuronen. Beachte, dass diese topografisch voneinander abgegrenzt sind.





**Abbildung 26. Konfokalbilder eines Kompletpräparats (Wholemount) eines Tauben-CG, immunhistochemisch markiert auf ChAT (grün) und GAD (rot).**

Eine Subpopulation von, sowohl „cap-like“ oder Kappen-ähnlichen Endigungen, die Ciliarneurone kontaktieren (dünne Pfeile), als auch „boutonal endings“ oder Knöpfchen-ähnlichen Endigungen, welche Choroidneurone kontaktieren (Pfeile mit ausgefüllter Pfeilspitze), war GAD-positiv. Beachte, dass die großen roten Strukturen keine neurone, sondern Endigungen darstellen. Die Pfeilspitze markiert ein ChAT-positives Neuron, welches keinen GABAergen Eingang erhält. Die abgegrenzte Lage der Choroidneurone gegenüber den Ciliarneuronen ist deutlich sichtbar.

Der Maßstab in C = 100µm gilt auch für A und B. NIII = N. oculomotorius

### 3.2.4 GABAergen Input auf CG-Neurone bei verschiedenen Spezies

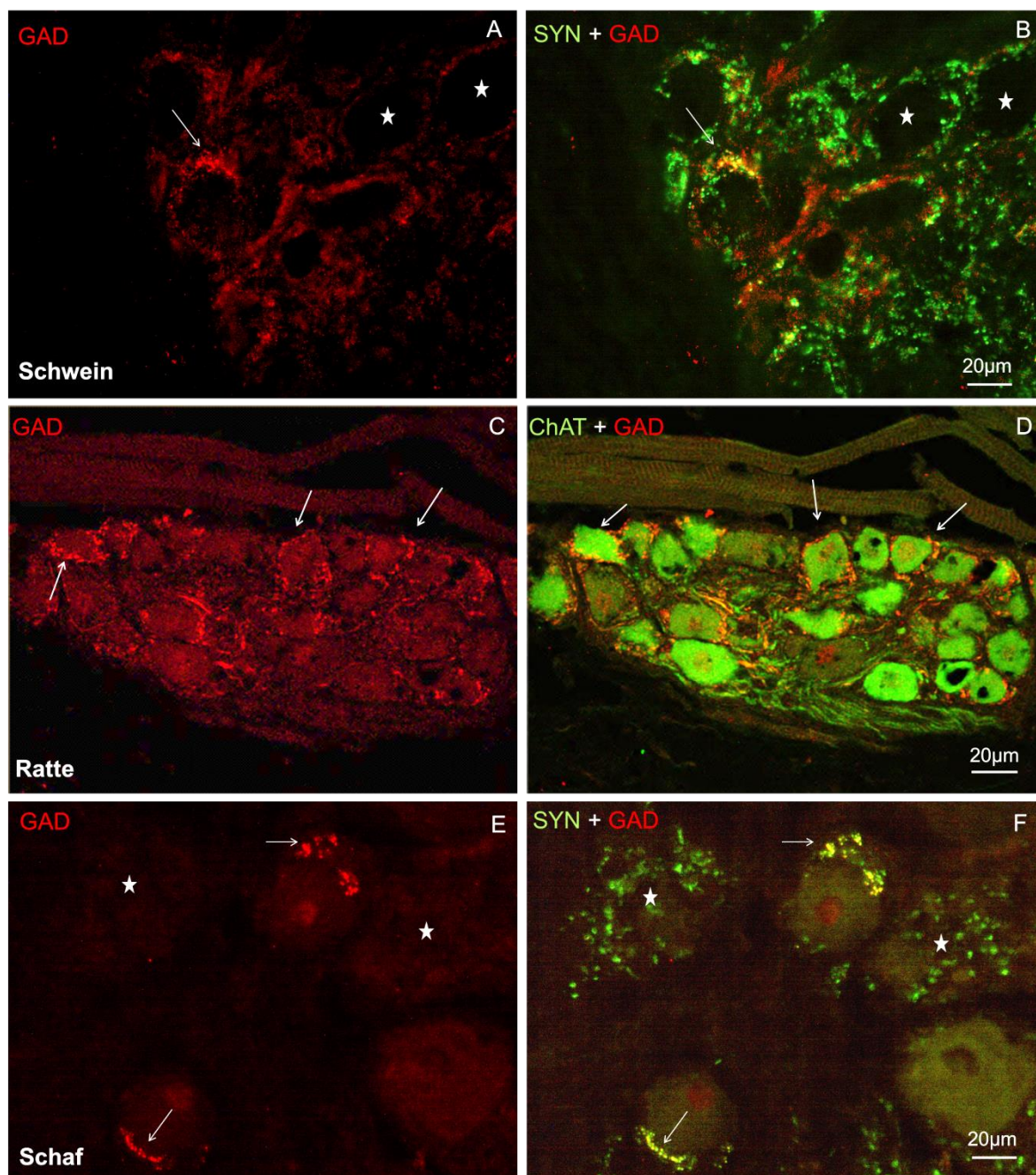
*Bei allen untersuchten Vertebraten erhält das CG einen GABAergen Input in unterschiedlichem Ausmaß*

Die CG von 6 verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen visuellen Fähigkeiten und unterschiedlicher Augenposition wurden untersucht.

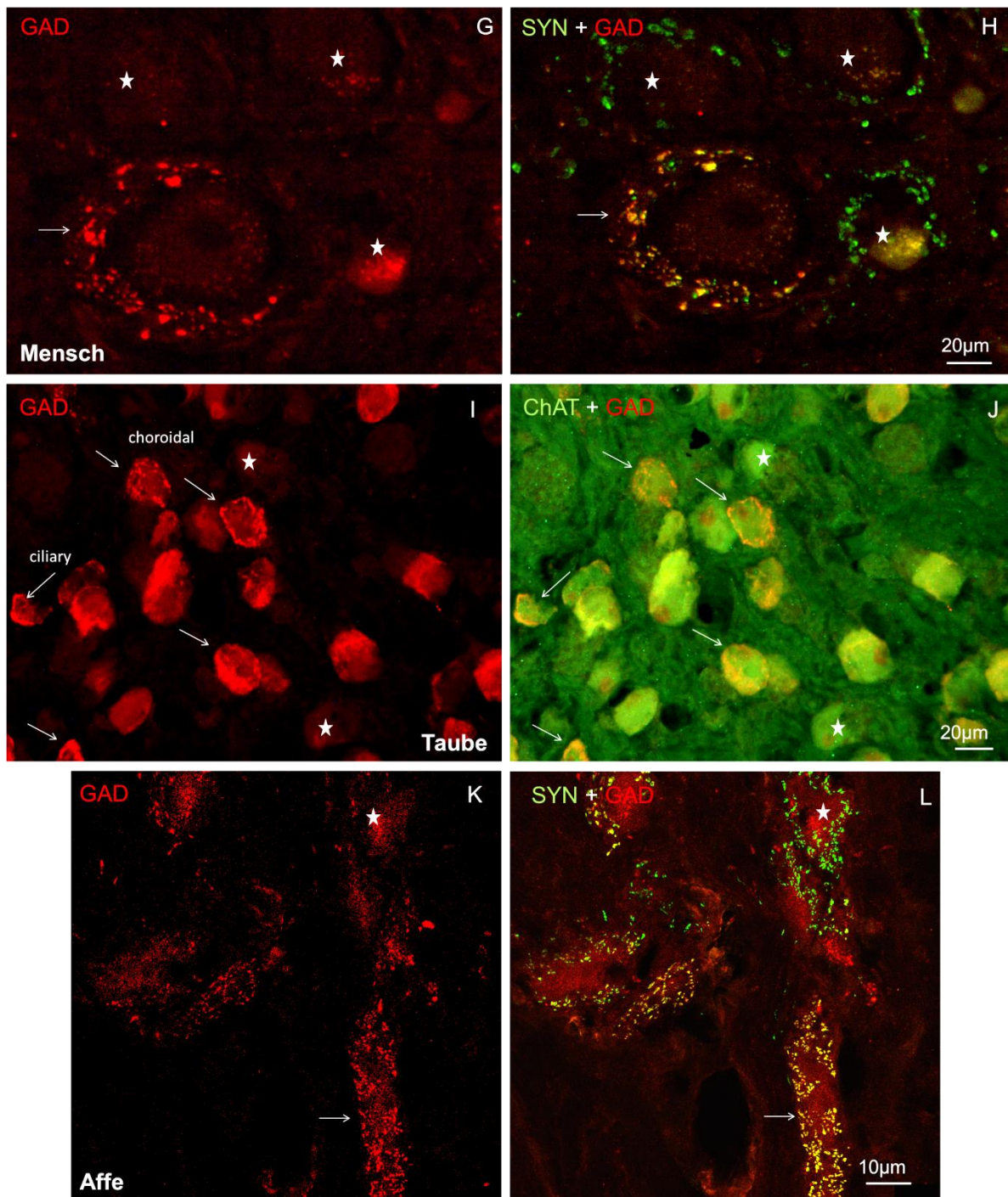
Die quantitative Analyse der CG verschiedener Tierspezies bezüglich des GABAergen Inputs auf postganglionäre Neurone ergab, dass bei allen Spezies eine Subpopulation der CG-Neurone von GAD-positiven Terminalen kontaktiert wird (Abb. 27, rot, Pfeile, für Prozentangaben siehe Tabelle 2).

Die meisten GABA-rezipienten Neurone (52% der gesamten CG-Neuronpopulation) waren dabei bei der Ratte zu sehen (Abb. 27C+D), die wenigsten (0,5%) beim Schaf (Abb. 27E+F). Während bei Schwein (Abb. 27A+B) und Affe (Abb. 27K+L) ca. 18% aller CG-Neurone einen GABAergen Eingang erhielten, bewegte sich die Prozentzahl beim Menschen (Abb. 27G+H) um die 3,4%. Bei der Taube (Abb. 27I+J) wird jeweils eine Subpopulation von, sowohl Choroidneuronen, erkennbar an den sie kontaktierenden Knöpfchen-ähnlichen Terminalen, als auch Ciliarneuronen (diese sind von Kappen-ähnlichen Terminalen umgeben) von GAD-positiven Endigungen kontaktiert. Von allen Choroidneuronen waren 39% GABA-rezipient, von allen Ciliarneuronen 30%.

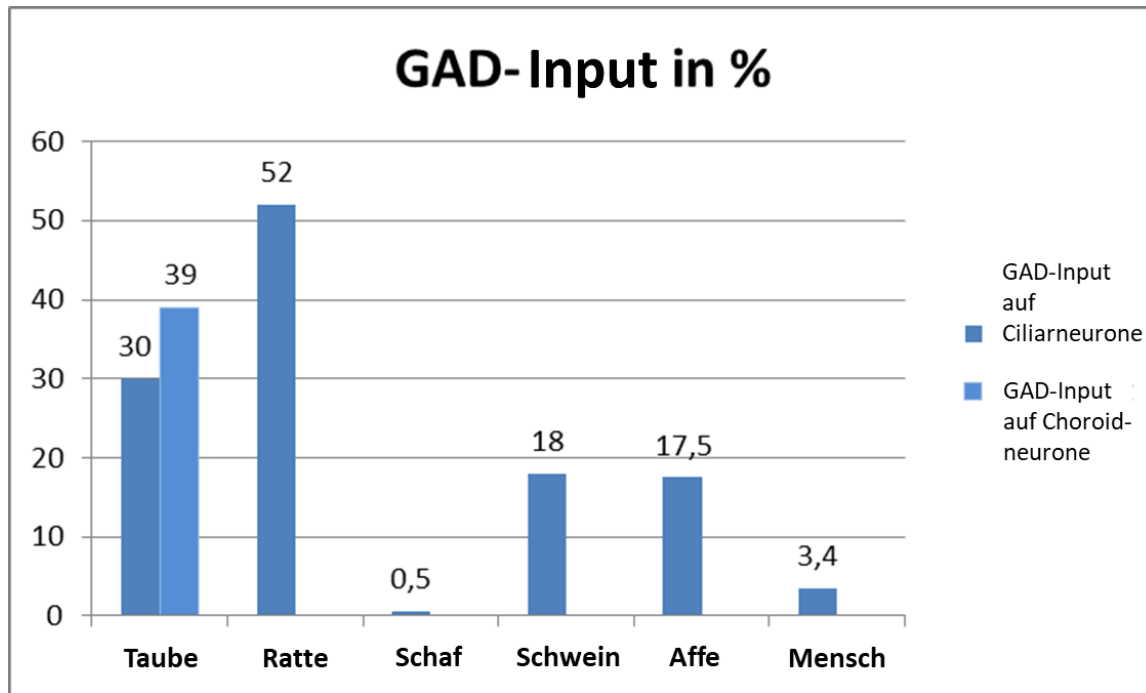
Die ermittelten Prozentzahlen der CG-Neurone, die bei der jeweiligen Spezies einen GABAergen Eingang erhalten, sind Tabelle 2 zu entnehmen.







**Abbildung 27.** Konfokalbilder von CG-Schnitten verschiedener Wirbeltierspezies immunhistochemisch gefärbt auf GAD (rot) und ChAT oder Syn (grün). Pfeile markieren Neurone, die einen GABAergen Eingang erhalten. In allen Spezies wird eine Subpopulation von CG-Neuronen von GAD-positiven Knöpfchen kontaktiert (Pfeile). Die Co-Lokalisation von Syn und GAD zeigt, dass es sich bei den GAD-positiven Knöpfchen um Terminalen handelt (gelb). Sterne markieren Neurone, die keinen GABAergen Input erhalten.



**Tabelle 2. Prozentsatz der CG-Neurone, die einen GABAergen Eingang erhalten bei verschiedenen Wirbeltier-Spezies.**

Anzahl der Untersuchten Tiere:

Taube: 4, Ratte: 7, Schaf: 2, Schwein: 2, Affe: 10, Mensch: 2 Individuen

### 3.3 LOKALISATION DER QUELLE DER GABAERGEN ENDIGUNGEN IM CG BEIM RHESUSAFFEN

#### 3.3.1 Anterograde Tract-Tracer Injektionen in das supraoculomotorische Areal (SOA)

Nachdem keine GAD-positiven Neurone innerhalb des CG identifiziert wurden, die als lokale Quelle der GABAergen Eingänge postganglionären Neurone hätten dienen können, wurde der Hirnstamm als mögliche Quelle untersucht. Insgesamt erhielten 4 Affen (*Macaca mulatta* oder *fascicularis*) eine Tract-Tracing Injektion mit Biotindextran (BDA)(M11-08, VH2-18) oder der nicht-toxischen Untereinheit B von Cholera toxin (CTB)(RDo10, A09060) in den Nucleus oculomotorius (nIII), inklusive des unmittelbar dorsal gelegenen supraoculomotorischen Areals (SOA) mit Beteiligung des EWpg, oder umliegende Areale (Kontrollfälle).

#### Lokalisation der Injektionen

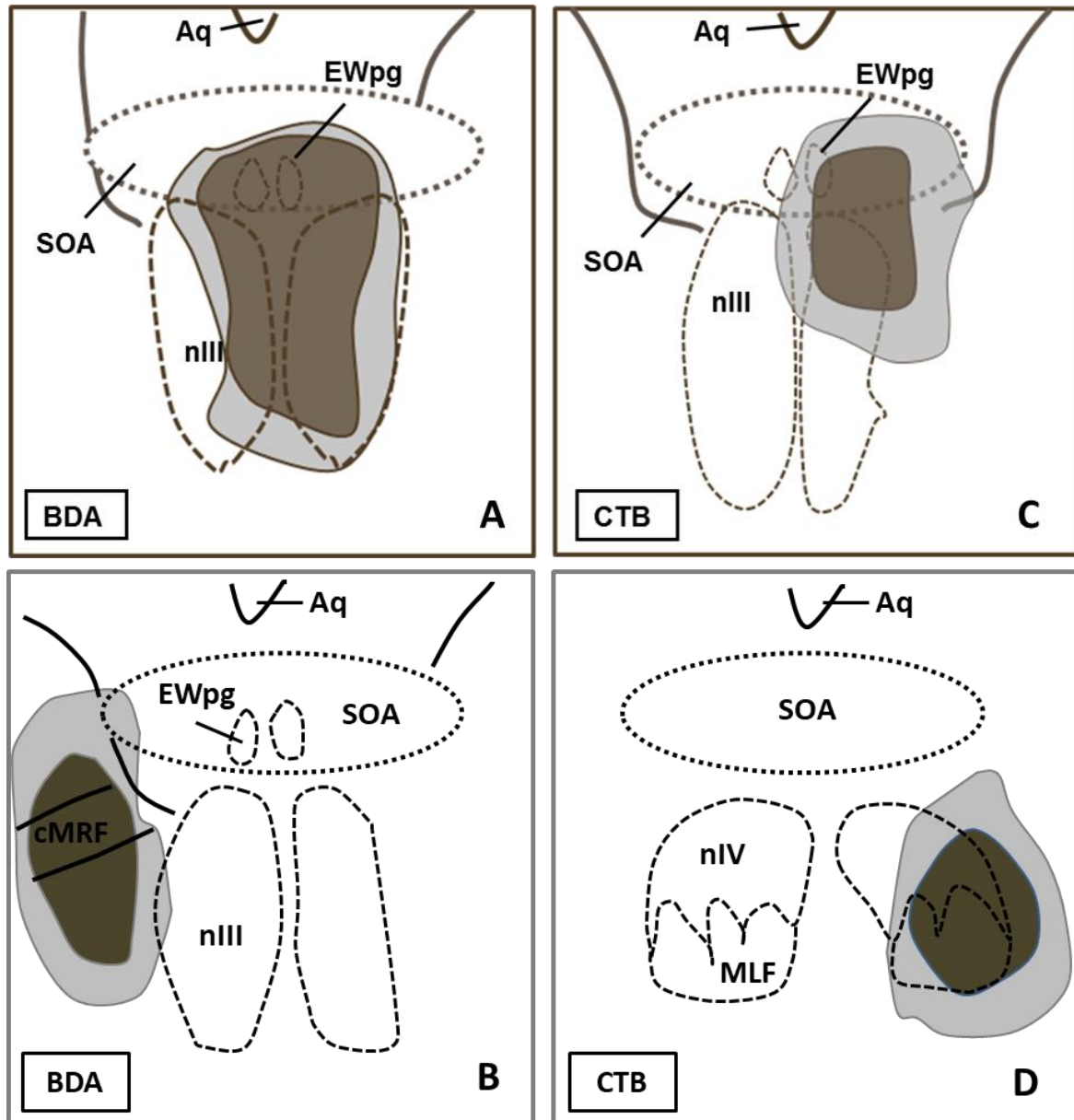
Die genauen Injektionsstellen wurden durch immunhistochemische Färbungen mehrerer Gehirnschnitte auf Höhe des nIII auf BDA bzw. CTB identifiziert.

**Fall 1 (A):** Die **BDA**-Injektion von Fall M11-08 saß medial und schloss die medialen Anteile des nIII mit ein. Ebenso betroffen waren der dorsal liegende EWpg, sowie das ihn umgebende mediale supraoculomotorische Areal im periaquaeduktalen Grau (Abb. 28A).

**Fall 2 (B):** Die **BDA**-Injektion von Fall VH2-18 traf die zentrale Formatio reticularis im Mesencephalon (central mesencephalic reticular formation). Sie saß etwas zu weit lateral, um den Oculomotoriuskern, den EWpg oder die SOA zu erreichen. Dieser Fall diente als Kontrollfall, da man vermutete, dass hier kein Tracer im CG zu finden sei (Abb. 28B).

**Fall 3 (C):** Die **CTB**-Injektion von Fall RDo10 umfasste den dorsalen Teil des rechten nIII, einschließlich des darüber gelegenen rechten EWpg, sowie das laterale supraoculomotorische Areal (Abb. 28C).

**Fall 4 (D):** Die **CTB**-Injektion von Fall A09060 traf ausschließlich den rechten Nucleus trochlearis (nIV) am Unterrand und den darunter gelegenen Fasciculus longitudinalis medialis (MLF) (Abb. 28D). Auch dieser Fall diente als Kontrolle.



**Abbildung 28. Rekonstruktion der Tracer-Injektionsstellen.**

A. Rekonstruktion der BDA-Injektionsstelle in den Nucleus oculomotorius (nIII) und den Edinger-Westphal Kern (EWpg). Das laterale, supraoculomotorische Areal (SOA) blieb von der Tracerinjektion ausgespart. B. Rekonstruktion der BDA-Injektion in die linke cMRF. Dieser Fall ist ein Kontrollfall. C. Cholera toxin Untereinheit B-Injektion (CTB) in den rechten Nucleus oculomotorius unter Einschluß des rechten Edinger-Westphal Kern (EWpg) und des lateralen, supraoculomotorischen Areals (SOA). D. Rekonstruktion einer CTB-Injektion in den rechten Nucleus trochlearis (nIV), sowie den Fasciculus longitudinalis medialis (MLF). Kontrollfall. Dunkles grau zeigt das Uptake-Areal des Tracers. Helles grau beschreibt die angenommene Ausbreitung des Tracers.

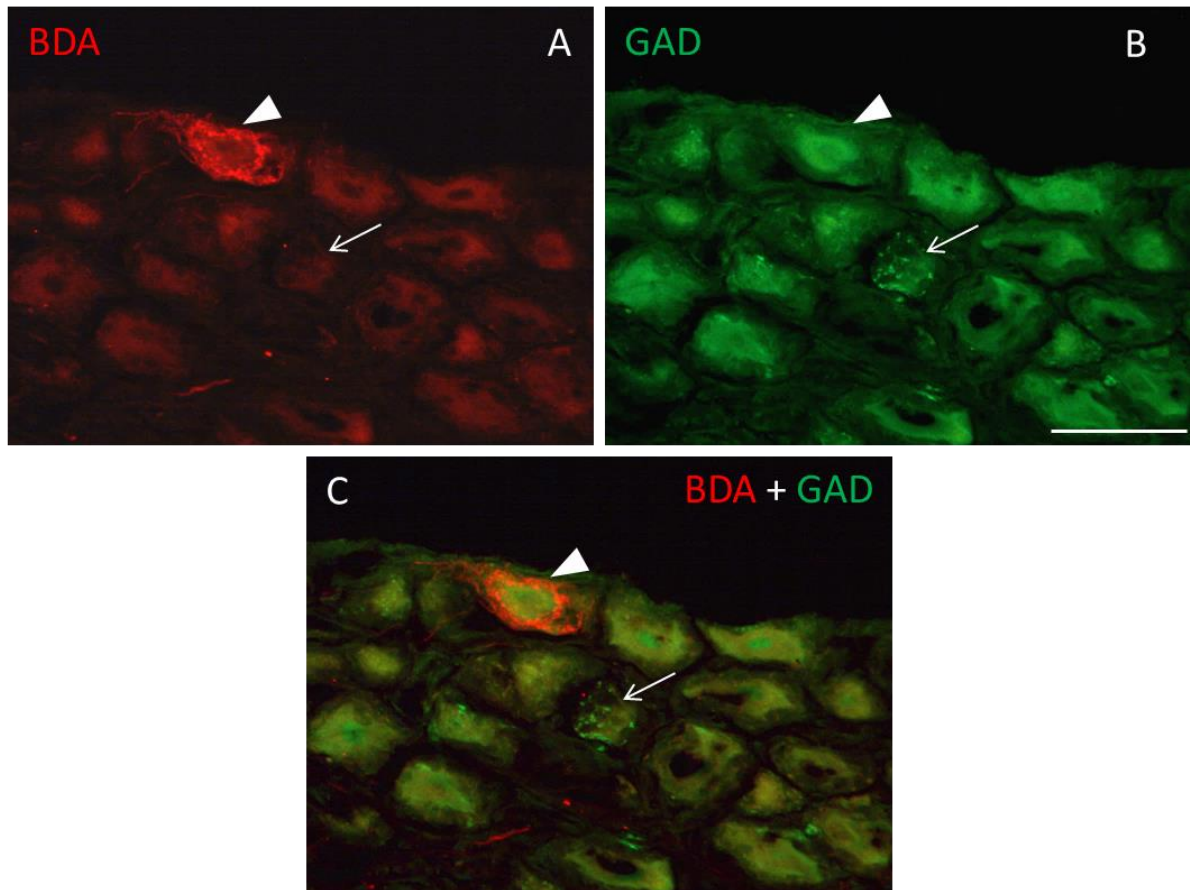
Fall 1: BDA-Injektion, zentral in den Nucleus oculomotorius (mediale Injektion)

*Tracer-markierte Terminalen im CG*

Bei der Analyse des CG fanden sich BDA-positive Endigungen, die postganglionäre CG-Neurone kontaktierten (Abb. 29A).

**Weniger als 1% aller Tracer-markierten Terminalen zeigen eine Co-Lokalisation von BDA und GAD**

In allen untersuchten Schnitten fanden sich lediglich sehr vereinzelt BDA-markierte Terminalen (rot), die zugleich GAD-positiv (grün) waren. Im Regelfall waren die Terminalen entweder BDA- (Abb. 29A, Pfeilspitze, rot) oder GAD-positiv (Abb. 29B, Pfeil, grün). Diese Beobachtung legt nahe, dass der GABAerge Eingang auf die Neurone im CG nicht von dem Areal direkt um den EWpg stammt bzw. das Areal nur ganz am Rand getroffen wurde und sich der Großteil der GABAergen, präganglionären Neurone, die die Quelle der GABAergen Terminalen im CG darstellen, außerhalb des Tracer-Uptake-Areals befindet.



**Abbildung 29. Fluoreszenzfärbung auf BDA und GAD im CG eines Rhesusaffen.**

Das Bildpaar A und B zeigt denselben Ausschnitt in unterschiedlichen Fluoreszenzbeleuchtungen. C zeigt die Überlagerung von A und B. Terminalen zeigen entweder BDA- (A, Pfeilspitze) oder GAD-Immunreaktivität (B, Pfeil), jedoch nur sehr vereinzelt (<1%) beide (nicht gezeigt), nach BDA-Injektion medial in den nIII und EWpg. Der Maßstab in B = 50µm gilt für A und C.



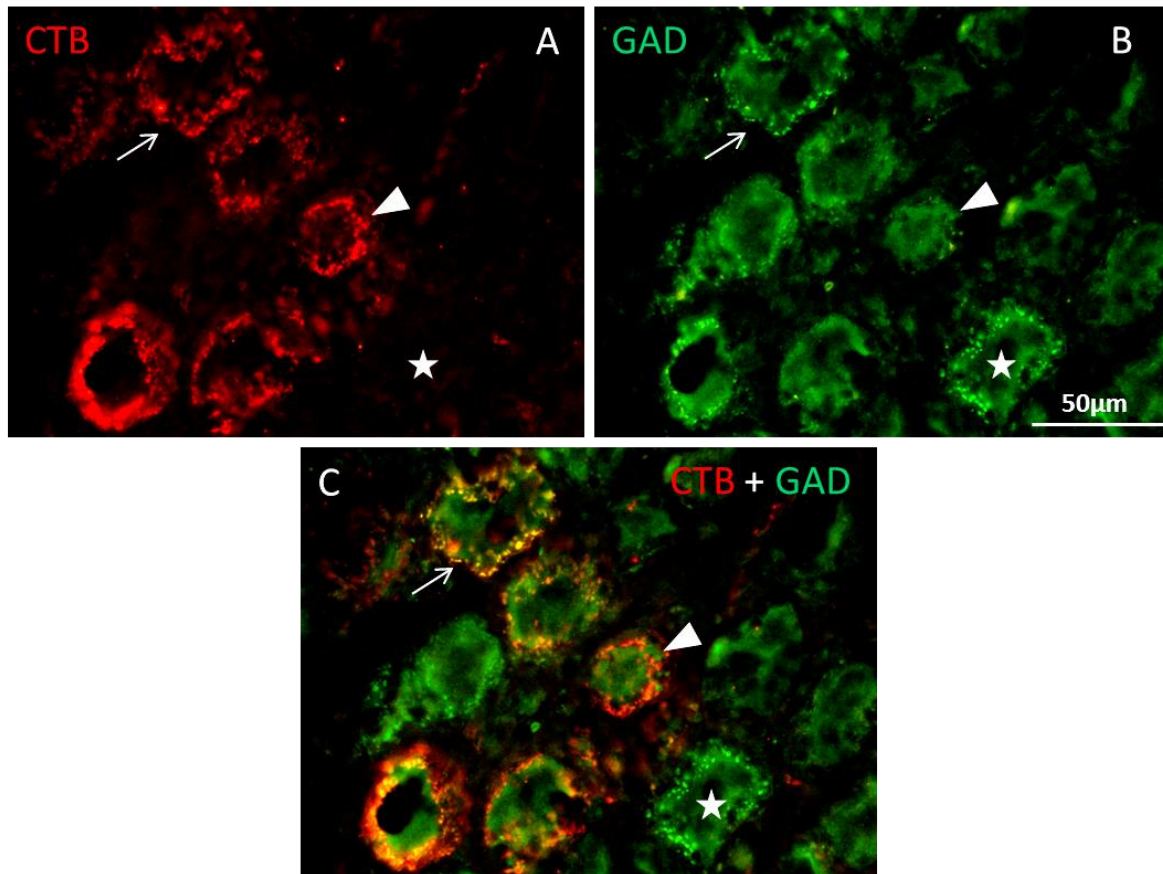
Fall 3: CTB-Injektion in den rechten Nucleus oculomotorius (laterale Injektion)

*Tracer-markierte Terminalen im CG*

Wie auch in Fall 1 ergab die Analyse des CG auf den anterograd transportierten Tracer, dass zahlreiche Neurone mit CTB-positiven Terminalen assoziiert waren (Abb. 30 A, rot). Auffällig war, dass optisch insgesamt sogar mehr Terminalen Tracer-positiv waren, als in Fall 1. Das ist unerwartet, da bekannt ist, dass der EWpg der Sitz der präganglionären, cholinergen Neurone, die zum CG projizieren, ist (McDougal and Gamlin, 2015). Unter diesem Gesichtspunkt müsste die Injektion direkt in den EWpg (Fall 1) in mehr Tracer-positiven Terminalen im CG resultieren, als eine laterale Injektion, bei der der EWpg nicht vollständig getroffen wurde. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in Fall 3 nicht die präganglionären Neurone selbst, sondern so gut wie alle Fasern, ausgehend vom EWpg, sowie den GABAergen präganglionären Neuronen getroffen wurden und daher insgesamt sehr viele Endigungen im CG mit Tracer markiert und viele von diesen gleichzeitig GAD-positiv waren.

**Doppelmarkierte Terminalen im CG mit CTB und GAD**

Die systematische Untersuchung des CG zeigte zudem, dass zahlreiche Tracer-markierte Endigungen gleichzeitig GAD-immunreaktiv waren (Abb. 30, Pfeile). Das deutet darauf hin, dass die GABAergen präganglionären Neurone im Bereich des Tracer-Uptake-Areals im Hirnstamm, genauer im lateralen SOA liegen. Insgesamt fanden sich zahlreiche CTB-positive Terminalen im CG. Viele von ihnen zeigten keine GAD-Immunreaktivität, waren jedoch Tracer-positiv (Abb. 30, Pfeilspitzen). Es wird davon ausgegangen, dass diese den klassischen cholinergen Eingang ins CG vom EWpg repräsentieren.



**Abbildung 30. Fluoreszenzfärbung auf CTB (A) und GAD (B) im CG eines Rhesusaffen.**

Das Bildpaar A und B zeigt denselben Ausschnitt des rechten CG eines Rhesusaffen, der eine Tracerinjektion mit CTB in den rechten nIII, EWpg, sowie die laterale SOA erhalten hatte, in unterschiedlichen Fluoreszenzbeleuchtungen. Terminalen zeigen gleichzeitig Immunreaktivität auf CTB (A) und GAD (B) (Pfeile, siehe C, gelb). Einige Terminalen sind ausschließlich GAD-positiv (Stern), während andere nur Tracer-positiv sind (Pfeilspitzen). Der Maßstab in B gilt für A und C.

#### Fall 2 + 4: BDA- bzw. CTB-Injektion außerhalb des nIII-Komplexes

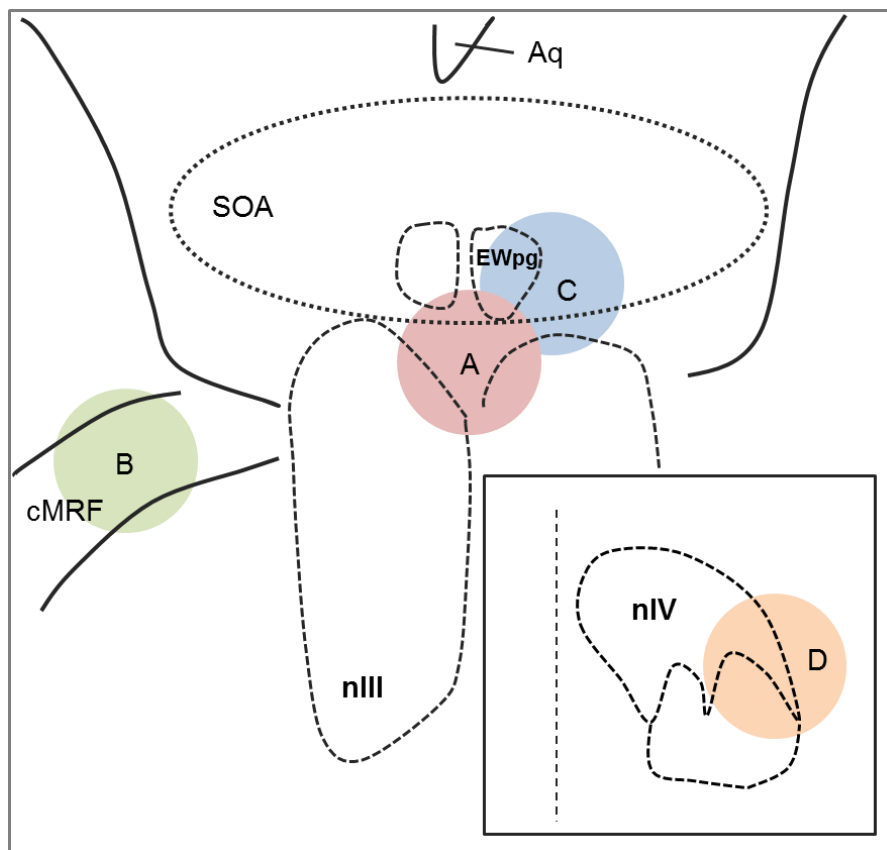
##### *Keine Tracer-positiven Endigungen im CG*

In beiden Fällen resultierten die durchgeführten Injektionen in Tracer-freien CG-Schnitten. Es wurde nicht vermutet Tracer-markierte Neurone im CG zu sehen, da die Injektionsstellen jeweils nicht die Areale getroffen hatten, von denen bekannt ist, dass diese präganglionäre Neurone beinhalten, die zum CG projizieren (z.B. EWpg). Damit kann relativ sicher ausgeschlossen werden, dass sich die präganglionäre Population GABAerger Neurone im Bereich der beiden Injektionsstellen (cMRF und nIV) befindet.



Sowohl in Fall 2, als auch in Fall 4 wurde jedoch die mittlerweile bekannte Subpopulation postganglionärer CG-Neurone von GAD-positiven Terminalen kontaktiert.

Abbildung 31 zeigt nochmals eine schematische Übersicht über die Lokalisation der Tracerinjektionen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass Injektion A in BDA-positiven Terminalen im CG resultierte. Diese waren jedoch nicht gleichzeitig GAD-positiv (>99%). Bei Injektion B fanden sich, wie vermutet, keine BDA-positiven Endigungen im CG. Dieses Areal kann als Quelle des GABAergen Eingangs ins CG ausgeschlossen werden. Injektion C resultierte in zahlreichen CTB-positiven Endigungen im CG. Viele dieser Endigungen zeigten gleichzeitig eine GAD-Immunreaktivität. Nach Injektion D ließen sich keine CTB-positiven Endigungen im CG nachweisen. Auch dieses Areal kann als Quelle des GABAergen Eingangs ins CG ausgeschlossen werden.



**Abbildung 31. Schematische Übersicht der durchgeführten Tracer-Injektionen.**

### 3.3.2 Präganglionäre GABA/Cholinerge Neuronenpopulation im Mittelhirn

Mittels einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung im CG beim Affen, wurde nachgewiesen, dass GAD und ChAT in einer Subpopulation der Terminalen im CG co-lokalisiert sind. Die anterograden Tract-Tracing Injektionen ins Mittelhirn beim Affen lassen vermuten, dass die präganglionären Neurone dieser GAD/ChAT-positiven Terminalen im CG im Bereich des EWpg und des, ihn umgebenden, SOAs liegen. Um das Vorkommen von GABA/ACh-Neuronen in diesem Bereich zu untersuchen, wurden einige benachbarte Mittelhirnschnitte eines Rhesusaffen auf GAD oder ChAT immunhistochemisch gefärbt.

Durch Ausplotten mit Neurolucida wurde deutlich, dass sich im gesamten SOA zahlreiche GAD-positive Neurone befinden (Abb. 32). Besonders im caudalen Bereich des Nucleus oculomotorius (nIII) waren zwei Populationen GAD-positiver Neurone voneinander abgrenzbar:

Die eine Population war im lateralen SOA, dorsolateral zum EWpg lokalisiert (Abb. 32, Rechtecke A). Eine zweite Population GAD-positiver Zellen befand sich dorsomedial zum nIII (Abb. 32, Rechteck B). Diese Neurone waren auf etwa gleicher Höhe mit den ChAT-positiven Neuronen des EWpg lokalisiert und waren zudem stark mit diesen vermischt. Beide GAD-positiven Zellgruppen liegen innerhalb des Areals, das bei der CTB-Injektion von Fall 3 betroffen war.

Beachte, dass in keinem der Schnittpaare eindeutig doppeltmarkierte Neurone gefunden wurden.



**Abbildung 32. Plot benachbarter Mittelhirnschnitte eines Affen immunhistochemisch gefärbt auf GAD oder ChAT.** Rote Kreise zeigen die Verteilung der ChAT-positiven Neurone, schwarze Kreise die, der GAD-positiven Neurone. Beachte die zwei voneinander abgegrenzten Populationen GAD-positiver Neurone im caudalen Bereich des nIII, markiert durch die Rechtecke A und B. Aq= Aquädukt, EWpg = Edinger-Westphal Kern präganglionär, nIII = Nucleus oculomotorius.



## 4 DISKUSSION

### 4.1 CHARAKTERISIERUNG DER GABAERGEN EINGÄNGE

Durch die Verwendung von Licht- und Elektronenmikroskopie in Kombination mit immunhistochemischen Färbemethoden konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass zusätzlich zu dem bekannten cholinergen Eingang eine Subpopulation postganglionärer CG-Neurone beim Affen, sowie weiteren untersuchten Wirbeltierspezies, einen direkten synaptischen Eingang von cholinergen Terminalen, die zugleich Marker für den inhibitorischen Neurotransmitter GABA co-exprimieren, erhält. Folglich werden postganglionäre CG-Neurone von entweder cholinergen, oder cholin-/GABAergen Terminalen kontaktiert. Dass dieser Eingang funktionell ist, wird auf Grund der vorhandenen GABA-Rezeptoren an allen CG-Neuronen vermutet. Der starke ChAT-positive Eingang auf nahezu alle postganglionären, cholinergen Neurone im Affen-CG stimmt mit der bekannten Organisation der efferenten, parasympathischen, motorischen Innervationskette überein (Neuhuber and Schrödl, 2011; McDougal and Gamlin, 2015). Diese Efferenzen entstammen präganglionären, cholinergen Neuronen im Edinger-Westphal Kern (EWpg), deren Axone mit dem N. oculomotorius zum CG verlaufen (Horn et al., 2008; May et al., 2008a; May et al., 2008b; Kozicz et al., 2011).

Im CG der meisten Wirbeltierspezies befinden sich zwei Untergruppen postganglionärer Neurone, die entweder zum M. sphincter pupillae oder zum M. ciliaris projizieren und damit die Pupillenkonstriktion oder die Nah-Akkommodation vermitteln. Beim Vogel wird über postganglionäre CG-Neurone zusätzlich der Blutfluss in der Aderhaut geregelt (Reiner et al., 1991). Durch die beiden (bzw. drei) funktionell unterschiedlichen Neuronen-Subpopulationen im CG liegt es nahe zu vermuten, dass der ChAT/GABA Input nur eine dieser unterschiedlichen Populationen ansteuert, um eine bestimmte Funktion zu erfüllen. Denervationsstudien beim Affen deuten allerdings an, dass nur etwa 3% der gesamten CG-Neuronenpopulation den M. sphincter pupillae innerviert, während der Großteil der postganglionären Neurone den M. ciliaris kontrolliert (Warwick, 1954). Obwohl die Prozentangabe für die Pupillenneurone vermutlich zu niedrig angesetzt ist (Erichsen and May, 2002), scheinen die Prozentangaben der Neurone, die in der

aktuellen Studie einen GABA/ChAT Eingang erhalten (Affe: ca. 20%), nicht den bisher beobachteten Prozentangaben an postganglionären Pupillenneuronen beim Affen zu entsprechen. Mit retrogradem Tract-Tracing bei Affe und Ratte und immunhistochemischen Methoden wurde gezeigt, dass vermutlich sowohl Pupillen- und Akkommodationsneurone, als auch Choroidneurone beim Vogel diesen GABAergen Eingang erhalten und damit der M. sphincter pupillae, der M. ciliaris und die Aderhaut, zumindest beeinflusst werden.

#### **4.1.1 Nervenendigungen im CG**

Die Ergebnisse bezüglich der CG-Ultrastruktur decken sich mit den Erkenntnissen aus früheren Studien beim Affen (May and Warren, 1993; Zhang et al., 1994a), in denen beschrieben wurde, dass Axon-Terminalen hauptsächlich Dendriten und nicht Somata im perisomatischen Neuropil kontaktieren. Das Vorkommen dreier unterschiedlicher Axon-Terminaltypen, basierend auf der Morphologie der synaptischen Vesikel und des synaptischen Spalts, konnte bestätigt werden, weswegen die zuvor von May & Warren (1993) eingeführte Nomenklatur übernommen wurde. Klassischerweise können exzitatorische und inhibitorische Synapsen anhand ihrer morphologischen Merkmale unterschieden werden. Während exzitatorische Synapsen sphärische (runde), klare Vesikel und asymmetrische Verdichtungen der Membran am synaptischen Spalt besitzen, so kommen bei inhibitorischen Synapsen länglichere, pleomorphe Vesikel und symmetrische synaptische Membranverdichtungen vor (Gray, 1969). Kleine, klare Vesikel (ca. 40 nm) gelten als Speicher für schnell-agierende (Fast-acting) Transmitter, während vermutet wird, dass dense-core Vesikel (Vesikel mit dichtem Kernmaterial) Peptide speichern (Torrealba and Carrasco, 2004; als Review siehe Harris and Weinberg, 2012). Zieht man die morphologischen Merkmale des beobachteten At<sub>1</sub>-Synapsentyps in Betracht (asymmetrische Membranverdichtungen am synaptischen Spalt, sphärische Vesikel und das häufige Vorkommen), so liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Typ um die wohl bekannten exzitatorischen, ChAT-positiven Eingänge von präganglionären EW(pg)-Neuronen, die Signale zur Muskelkontraktion an den M. sphincter pupillae und den M. ciliaris weiterleiten, handelt (zur Übersicht siehe McDougal and Gamlin, 2015).

Die selektive GABA-Immunogold-Markierung des At<sub>2</sub>-Typs, welcher durch eine höhere Vesikelanzahl mit dichtem Kernmaterial und symmetrischer anmutende synaptische Verdichtungen, als beim At<sub>1</sub>-Typ charakterisiert war, deutet darauf hin, dass dieser Typ eine eigenständige Klasse von Terminalen darstellt, die sich von der At<sub>1</sub>-Klasse unterscheidet. Da lichtmikroskopisch untersuchte Doppelimmunfluoreszenzfärbungen gezeigt haben, dass in allen GAD-positiven Terminalen gleichzeitig ChAT co-lokalisiert ist, ist anzunehmen, dass diese GAD-positiven Terminalen als Äquivalent zu dem, im EM beobachteten GABA-positiven At<sub>2</sub>-Typ angesehen werden können. Die Co-Lokalisation von GABA, einem klassischen inhibitorischen Neurotransmitter im Zentralnervensystem und ACh, im CG exzitatorisch, gibt Anlass zu der Vermutung, dass die Synapsen mit co-lokalisierten erregenden und hemmenden Transmittern eine besondere Morphologie aufweisen. Die beobachteten morphologischen Merkmale deuten tatsächlich darauf hin, dass der At<sub>2</sub>-Typ weder eindeutig „klassisch“ inhibitorisch, noch exzitatorisch ist. Er zeichnete sich durch einheitlich „intermediate“ Merkmale zwischen exzitatorisch und inhibitorisch, in Form von etwas pleomorpheren Vesikeln und etwas weniger asymmetrischen Verdichtungen an der Postsynapse als beim vermutlich exzitatorischen At<sub>1</sub>-Typ, aus. At<sub>2</sub>-Typ Terminalen enthielten jedoch keine eindeutig flachen Vesikel, oder klar symmetrische Verdichtungen am synaptischen Spalt, was auf klassisch inhibitorische Synapsen zutreffen würde. Zhang et al. konnten in ihren EM-Studien bei der Katze (1993) und beim Affen (1994) dieses Phänomen ebenfalls beobachten (Zhang et al., 1993; 1994a). Sie beschrieben neben den klassisch exzitatorischen Synapsen mit asymmetrischen Verdichtungen der postsynaptischen Membran einige Synapsen (ca. 20%) mit sowohl flachen, als auch runden Vesikeln und symmetrischer wirkenden Membranverdichtungen am synaptischen Spalt.

Die dense-core Vesikel in At<sub>2</sub>-Terminalen enthalten vermutlich zusätzlich Peptide (siehe unten). Die synaptische Aktivität, die durch die Ausschüttung von ACh von diesen Terminalen produziert wird, wird demnach vermutlich nicht nur von GABA, sondern durch Neuropeptid-Ausschüttung, sowie „second messenger“ Aktivierung, moduliert.

Es gibt sehr wenige Studien, die die Co-Lokalisation von GABA und ChAT demonstrieren. Diese verwenden meistens benachbarte Schnitte, um ChAT mit „pre-embedding“ Immunhistochemie, gefolgt von „post-embedding“ GABA-Immunogold-

Markierungen nachzuweisen. Anders als in dieser Arbeit wurden in der primären visuellen Rinde bei der Katze keine ultrastrukturellen Unterschiede zwischen ChAT/GABA-positiven und -negativen Terminalen festgestellt (Beaulieu and Somogyi, 1991). Jedoch fand man im Nucleus dorsalis lateralis des Thalamus und den pedunculo pontinen Kernen hauptsächlich symmetrische Synapsen in ChAT/GABA-positiven Terminalen (Jia et al., 2003), die damit eindeutig einen anderen Typ als konventionelle ChAT-positive Terminalen darstellen. In der Oliva inferior der Ratte wurden sowohl symmetrische, als auch asymmetrische synaptische Verdichtungen an der postsynaptischen Membran bei individuellen ChAT/GABA-positiven Terminalen beobachtet, jedoch waren diese postsynaptisch unterschiedlich lokalisiert (Caffe et al., 1996).

Die Morphologie des Axon-Terminalentyps 3 (At<sub>3</sub>) lässt vermuten, dass dieser Typ im Vergleich zum At<sub>1</sub>- und At<sub>2</sub>-Typ eine funktionell völlig andersartige Population darstellt. Das Vorkommen von hauptsächlich dense-core Vesikeln könnte ein Indiz dafür sein, dass diese Endigungen Neuropeptide speichern und ausschütten (Zur Übersicht siehe Erichsen et al., 1982a, b; Reiner, 1987; Torrealba and Carrasco, 2004). Angesichts der Tatsache, dass in mehreren Studien ein synaptischer Eingang von peptidergen Afferenzen ins CG demonstriert wurde (Zhang et al., 1994b; Kirch et al., 1995; Grimes et al., 1998) ist es sehr wahrscheinlich, dass die At<sub>3</sub>-Endigungen einen Teil dieses Inputs repräsentieren. Das Fehlen von Membranverdichtungen am synaptischen Spalt bei diesen Endigungen wurde ebenfalls in einer früheren Studie beobachtet (May and Warren, 1993). Das unterstützt die Ansicht, dass es sich bei diesen peptidergen Endigungen um Terminalen handelt, die sich durch die Abwesenheit einer synaptischen Kontaktzone auszeichnen, da die Peptide mittels „volume transmission“ über einen Mechanismus, der eine vorübergehende Pore bildet, ausgeschüttet werden (zur Übersicht siehe Torrealba and Carrasco, 2004).

Eine Zusammenfassung der vermuteten Endigungstypen im Affen-CG ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:



Terminalentyp	Merkmale	Immunreaktivität
<b>Typ 1 (At<sub>1</sub>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• am häufigsten vorkommend</li> <li>• asymmetrische synaptische Membranverdichtungen</li> <li>• klare, runde Vesikel</li> <li>• keine oder wenige dense-core Vesikel</li> </ul>	cholinerg
<b>Typ 2 (At<sub>2</sub>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Im Wesentlichen die gleichen Komponenten wie At<sub>1</sub></li> <li>• mehr dense-core Vesikel als At<sub>1</sub></li> <li>• Membranverdichtungen am synaptischen Spalt etwas weniger asymmetrisch als bei At<sub>1</sub></li> </ul>	GABAerg/ cholinerg
<b>Typ 3 (At<sub>3</sub>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• selten</li> <li>• kleiner als At<sub>1</sub> und At<sub>2</sub></li> <li>• hauptsächlich dense-core Vesikel</li> <li>• synaptische Verdichtungen wurden nicht beobachtet</li> </ul>	peptiderg

Tabelle 3. Übersicht über die vermuteten Terminalentypen im Affen-CG.

#### 4.1.2 Co-Transmission von ACh/GABA im CG

Mit Konfokal-Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die GAD-Expression immer mit der ChAT-Immunreaktivität co-lokalisiert. GAD und ChAT sind die Schlüsselenzyme für die Biosynthese der Transmitter GABA und Acetylcholin. Die Expression dieser Syntheseeenzyme wird als Indikator für cholinerge und GABAerge neuronale Somata und Nervenendigungen benutzt (Strassman et al., 1987; Murphy et al., 1998). Die Co-Expression beider Enzyme in einer Teilpopulation von Terminalen, die postganglionäre Neurone im CG kontaktieren, lassen vermuten, dass sowohl GABA, als auch ACh von diesen Terminalen ausgeschüttet wird. Das ursprüngliche Konzept, dass „Ein Neuron einen bestimmten Transmitter“ verwendet – auch bekannt als „Dale’s Principle“ (Eccles et al., 1954) – wurde von vielen Studien hinterfragt. Für bereits mehrere Jahrzehnte ist das Konzept der Ausschüttung eines primären „schnellen“ Neurotransmitters, der Rezeptoren-gesteuerte Ionenkanäle in der postsynaptischen Membran öffnet und von einem zweiten „langsamen“

Neuropeptid, welches mittels eines „second-Messenger Systems“ die Aktivität an der Synapse modifiziert, begleitet wird, etabliert (Jan et al., 1979; Tritsch et al., 2012; Tritsch et al., 2014; Übersicht siehe Vaaga et al., 2014). In jüngerer Zeit gibt es immer mehr Evidenz für Zwei-Transmitter Neurone, die mehrere, primäre, schnell-agierende Transmitter freisetzen, Monoamine, ACh und GABA eingeschlossen (Jonas et al., 1998; Gundersen, 2008). Diese können unter anderem synergistische Effekte auf die gegenseitige Aktivität haben (Burnstock, 1976; Root et al., 2014; Shabel et al., 2014).

Man muss zwischen einer Form von Co-release, bei der zwei Transmitter in einer einzigen synaptischen Vesikelpopulation gespeichert und von dieser ausgeschüttet werden und der Co-Transmission, bei der die Transmitter in unterschiedlichen Vesikelpopulationen gespeichert werden unterscheiden (Hnasko and Edwards, 2012; Vaaga et al., 2014). In letzterem Fall ist es durch Mechanismen, wie unterschiedliche Kalziumsensitivität, oder die räumliche Trennung der Vesikel in unterschiedlichen Synapsen-Endknöpfchen möglich, die Transmitter unabhängig voneinander auszuschütten (Vaaga et al., 2014). In mehreren Hirnregionen befinden sich Terminalen, die gleichzeitig GABA und ACh freisetzen, wie beispielsweise im unteren Olivenkernkomplex (Ratte: Caffé et al., 1996), im Kortex (Katze: Beaulieu and Somogyi, 1991; Ratte: Saunders et al., 2015), im laterodorsalen Nucleus und den pedunculopontinen Kernen (Katze: Jia et al., 2003; Übersicht, siehe Granger et al., 2016). Die Neuronenpopulation, die bis jetzt jedoch am besten in Bezug auf die Co-transmission von GABA und ACh charakterisiert ist, sind die Starburst-Amakrin-Zellen in der Retina (Lee et al., 2010). Mit Aufnahmen von Wholemout-Präparaten der Retina beim Kaninchen konnte gezeigt werden, dass das ACh und GABA von Starburst-Amakrin-Zellen monosynaptisch an richtungsselektiven retinalen Ganglienzellen wirkt (Duarte et al., 1999; Zhou and Lee, 2008; Lee et al., 2010). Darüber hinaus wurden die Transmitter, abhängig von der externen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, differentiell von räumlich begrenzten Ausschüttungsorten freigesetzt, wobei die Freisetzung von GABA auf die Dendriten der Ganglienzellen beschränkt war. Die ACh-Ausschüttung war nicht räumlich begrenzt (Lee et al., 2010; Sethuramanujam et al., 2016). Durch die limitierten Möglichkeiten bezüglich der in dieser Studie verwendeten Methoden konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob GABA-positive und -negative Terminalen von unterschiedlichen präganglionären Neuronen stammen. Zudem kann nicht sicher gesagt werden, ob

ACh und GABA in denselben oder in jeweils separaten Vesikeln gespeichert und von dort freigesetzt werden, obwohl es keinen Hinweis darauf gibt, dass unterschiedliche klare Vesikeltypen in den At<sub>2</sub>-Endigungen lokalisiert sind. Studien im CG beim Huhn, in denen pharmakologische Substanzen auf das CG aufgebracht wurden, schlagen vor, dass Transmitterausschüttung von unterschiedlichen präsynaptischen Reservoirs aus geschieht (Tsen et al., 2000). Die Autoren demonstrierten die separate Lokalisation von postsynaptischen, exzitatorischen, nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) und inhibitorischen Glyzin-Rezeptoren (GlyR) unter den individuellen großen Calyx-förmigen Endigungen, deren ausschließliches Ziel die Ciliarneurone im CG beim Vogel sind. Ebenso wurden separate Ansammlungen an AChR und GlyR, die mit der postsynaptischen Seite von einzelnen Knöpfchen-ähnlichen Terminalen von Choroidneuronen assoziiert waren, gefunden (Tsen et al., 2000). Da sowohl Glyzin, als auch GABA die Cl-Leitfähigkeit in Hühnchen CG-Neuronen erhöht (Sorimachi et al., 1997), könnte ein Mechanismus für GABA/ACh Rezeptorlokalisierung, ähnlich dem für Gly/ACh durchaus möglich sein (Tsen et al., 2000).

#### **4.2 MÖGLICHE QUELLE DES GABAERGEN EINGANGS IM CG – PRÄGANGLIONÄRE NEURONE**

Eine große Bedeutung kam in dieser Arbeit der Fragestellung nach der Lokalisation der präganglionären GABAergen Neurone, welche die GABA-positiven Terminalen im CG bilden, zu.

Es gibt mehrere denkbare Möglichkeiten für die Quelle des GABAergen Eingangs auf postganglionäre CG-Neurone bei diversen Vertebraten. Neurotransmitter können über die drei Wurzeln (parasympathisch = Nervus oculomotorius, sympathisch = Plexus caroticus internus und sensibel = N. nasociliaris des ophthalmischen Astes des N. trigeminus) in das CG gelangen (McDougal and Gamlin, 2015). Der Ursprung dieser Wurzeln ist für den parasympathischen Anteil der EWpg im Mittelhirn, für den sympathischen Anteil das Ganglion cervicale superius (SCG) und den sensiblen Anteil das Ganglion trigeminale (TG). Jedes dieser Gebiete (EWpg, SCG, TG), inklusive dem

umliegenden Areal (v.a. im Mittelhirn im Bereich des EWpg, da dieses Kerngebiet keine abgeschlossene Struktur, wie ein Ganglion, darstellt) kommt als Quelle der GABAergen Terminalen, die postganglionäre, cholinerge CG-Neurone kontaktieren, in Frage. Zudem stellt sich die Frage nach möglichen GABAergen Interneuronen im CG. An Ratten, Katzen und Affen durchgeführte Studien lassen vermuten, dass es sich bei einigen der kleineren CG-Neurone um einen speziellen Typ von Interneuronen handelt (Ehinger and Falck, 1970; Zhang and Hoffmann, 1993). Anders als im SCG des sympathischen Systems bei der Ratte, wo bereits GABA-immunreaktive Interneurone demonstriert wurden (Wolff et al., 1986), konnten in dieser Studie jedoch keine Hinweise auf eine mögliche GABAerge Interneuron-Population im CG gefunden werden, die als mögliche Quelle des GABAergen Eingangs auf CG-Neurone fungieren könnte. Das Trigeminalganglion könnte, wie bereits erwähnt, theoretisch ebenso die Quelle des GABAergen Eingangs in das CG sein, da bekannt ist, dass trigeminale Fasern des Nervus nasociliaris durch das CG hindurch ziehen, um sensorische Informationen vom Augapfel, inklusive Cornea, zu vermitteln (Grimes and Von Sallmann, 1960; Lazarov, 2002; McDougal and Gamlin, 2015). Es wurde beispielsweise vermutet, dass Substanz P-positive Fasern, sowie NPY-positive Fasern, die beim Affen durch das CG ziehen möglicherweise an postganglionären CG-Neuronen Synapsen bilden (Zhang et al., 1994b; Grimes et al., 1998). Auch beim Menschen erhalten 18% aller CG-Neurone einen SP-positiven Eingang, sowie 12% einen Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP)-positiven Eingang aus vermutlich trigeminaler Quelle (Kirch et al., 1995). Obwohl bei verschiedenen Spezies bisher eine Subpopulation GABAerger Neurone im TG beschrieben wurde (Katze: 20.0% Stoyanova et al., 1998; Ratte: Hayasaki et al., 2006; Hayasaki et al., 2012), gibt es keine Hinweise für GABAerge Neurone im TG des Affen (Lienbacher, eigene Beobachtungen). Sowohl die signifikante Reduktion der GABA-Antwort im CG von Hühnern, nach präganglionärer Denervation (McEachern et al., 1989), als auch das Fehlen von GABA-immunreaktiven Endigungen in dissoziierten, embryonalen CG-Neuronen beim Huhn nach *in ovo* Denervation (Liu et al., 2006), weisen stattdessen auf die präganglionären Neurone im EWpg als mögliche Quelle des GABAergen Eingangs in das CG beim Vogel hin (McEachern et al., 1989).

Mit Tract-Tracing Methoden beim Affen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die mögliche Quelle der GABAergen Endigungen im CG im Mittelhirn, im

Bereich des SOA, befindet. Nach Tracer-Injektionen in das SOA fanden sich Tracer- und gleichzeitig GAD-immunreaktive Terminalen im CG, die darauf hinweisen, dass die Tracerinjektion das Areal traf, in dem sich die präganglionären GABAergen Neurone der GABAergen Endigungen im CG befinden. Die exakte Position der präganglionären Neurone bleibt jedoch ungeklärt. Da die GABA-positiven Terminalen im CG gleichzeitig ChAT exprimieren, wird nach einer Neuronenpopulation im Mittelhirn gesucht, die gleichzeitig GABA- und ChAT-positiv ist. Immunperoxidase-Färbungen in benachbarten Hirnschnitten eines Rhesusaffen auf GAD und ChAT sollten mögliche Populationen aufzeigen. Leider konnten in keinem der Schnittpaare doppelmarkierte Neurone entdeckt werden, jedoch wurden zwei voneinander abgegrenzte GAD-positive Neuronenpopulationen im SOA identifiziert, die beide im Bereich des möglichen Tracer-Uptake Areals liegen die Quelle der GABAergen Terminalen im CG sein könnten.

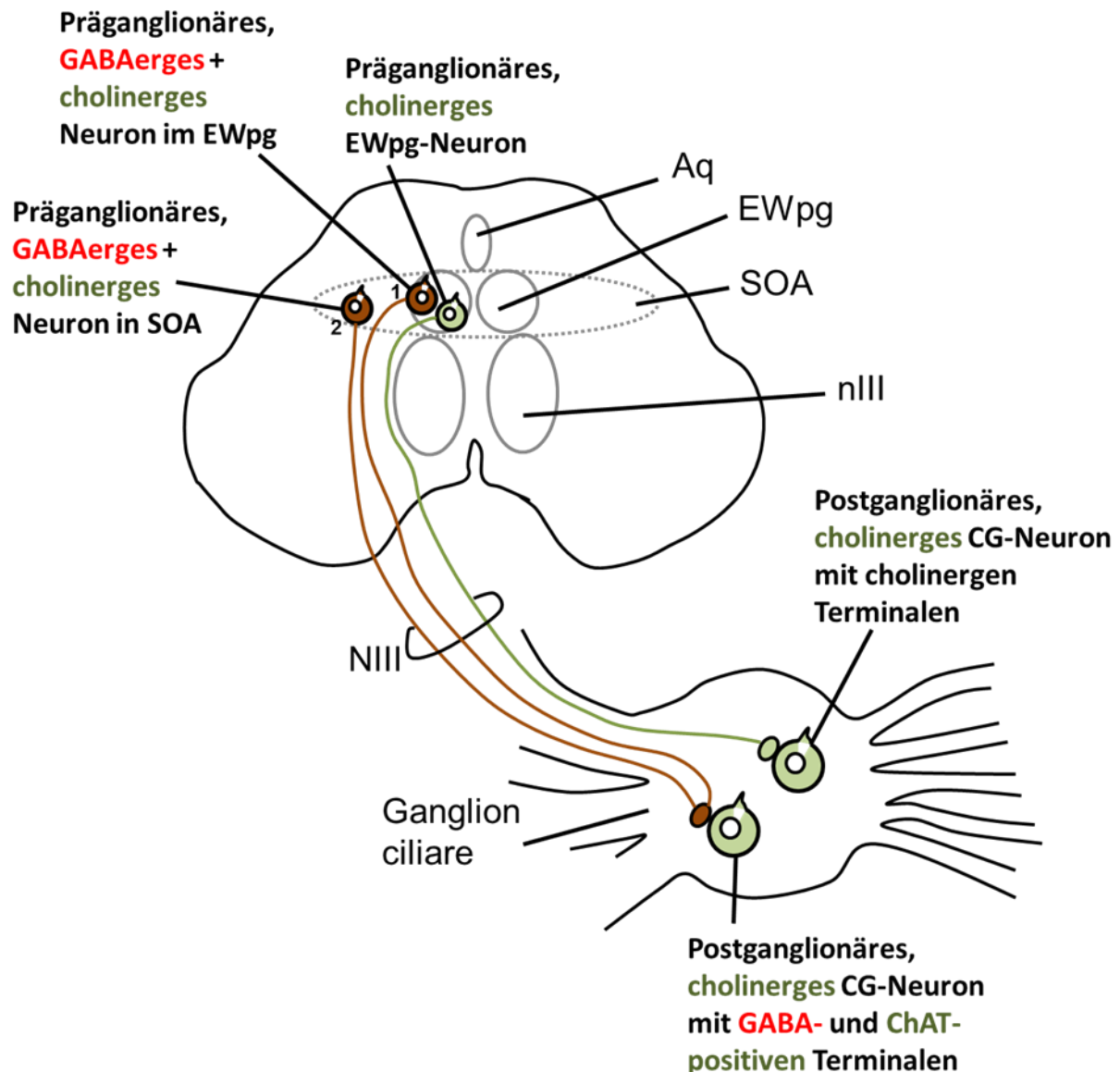
Der präganglionäre Edinger-Westphal Kern ist dafür bekannt, dass er die cholinergen Neurone enthält, die zum Ganglion ciliare projizieren, um Pupillenkonstriktion und Nah-Akkommodation zu vermitteln (McDougal and Gamlin, 2015). Da diese cholinerge Verbindung bereits bekannt ist, und in dem, durch die Tract-Tracing Injektionen, definierten Areal für präganglionäre Neurone liegt, wäre es denkbar, dass die gesuchte Population im EWpg liegt. Allerdings gibt es bis dato keine Arbeiten darüber, dass die Neurone im EWpg GABAerg sind. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten EWpg-Neuron-Somata keine GAD-Immunreaktivität. Allerdings waren zahlreiche GAD-positive Neurone stark mit den cholinergen EWpg Neuronen vermischt (vgl. Abb. 32). May et al. fanden heraus, dass die präganglionären EWpg-Neurone einen Eingang von cMRF-Neuronen erhalten (May et al., 2016). Die elektronenmikroskopische Untersuchung der cMRF-Eingänge auf EWpg-Neurone lässt darauf schließen, dass diese inhibitorisch sind (symmetrische Membranverdichtung am synaptischen Spalt, pleomorphe Vesikel etc.). Zeeh et al. vermuten, dass diese Eingänge GABAerg sind (Zeeh et al., 2015) und auch in hier verwendetem Material konnten GAD-positive Terminalen an EWpg-Neuronen beobachtet werden. Tatsächlich ist es bekannt, dass das cMRF GABAerge Neurone enthält (Appell and Behan, 1990) und es wurden GABAerge cMRF-Projektionen zum Colliculus superior und zum Nucleus Raphe interpositus beschrieben (Wang et al., 2010; Wang et al., 2013). Die cMRF-Projektion auf EWpg-Neurone ist nicht ausschließlich auf den kleinen, topografisch abgegrenzten Bereich, in dem sich die

Neurone für die Pupillenantwort befinden (Warwick, 1954; Erichsen and May, 2002; May et al., 2008b; Sun and May, 2014a; b) beschränkt, sondern erstreckt sich über die gesamte Ausdehnung des EWpg (May et al., 2016). Aus diesem Grund wird angenommen, dass dieser Eingang nicht ausschließlich auf Pupillenneurone oder Akkommodationsneurone wirkt, sondern an beiden Vorgängen, sowohl Pupillenkonstriktion, als auch Nah-Akkommodation beteiligt ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass die cMRF-Eingänge auf EWpg Neurone eine unerwartete Rolle bei der „near triad“ (Vergenz, Linsenakkommodation und Pupillenkonstriktion) spielen, ist daher groß. Diese Vermutung deckt sich mit den, im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der Funktion des GABAergen Eingangs ins CG.

Ungeklärt bleibt allerdings die Tatsache, dass ausschließlich eine Subpopulation der CG-Neurone von GABA/ChAT-positiven Terminalen kontaktiert wird. In diesem Fall müsste der EWpg eine Subpopulation von GABA/ChAT-Neuronen, sowie ChAT-Neuronen enthalten.

Eine weitere Möglichkeit für die Lokalisation der präganglionären GABA/ACh-Neurone ist das laterale SOA. Nach einer Tract-Tracer Injektion mit CTB (vergleiche Fall 3) in das laterale SOA beim Affen und einer anschließenden immunhistochemischen Untersuchung des Ganglion ciliare, waren zahlreiche CTB/GAD-immunreaktive Endigungen im CG zu sehen.

Durch die, in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, lässt sich folgende Organisation vermuten (Abb. 33):



**Abbildung 33. Schema der möglichen Organisation der Quelle des Eingangs ins CG.**

Variante 1: Die präganglionären GABA/ACh-Neurone liegen im Bereich des EWpg (Abb. 33, 1). Sie bilden GABA/ACh-positive Terminalen an ChAT-positiven CG-Neuronen. Zusätzlich projiziert die bekannte cholinerge, präganglionäre EWpg-Neuronenpopulation zu cholinergen, postganglionären CG-Neuronen und bildet dort cholinerge Terminalen.

Variante 2: Die präganglionären GABA/ACh-Neurone liegen im lateralen Bereich des SOA (Abb. 33, 2). Sie bilden GABA/ACh-positive Terminalen an ChAT-positiven CG-Neuronen. Zusätzlich projiziert die bekannte cholinerge, präganglionäre EWpg-Neuronenpopulation zu cholinergen, postganglionären CG-Neuronen und bildet dort cholinerge Terminalen.

Letztendlich Aufschluss über die genaue Lokalisation der GABAergen präganglionären Neurone könnte eine CG-Injektion liefern mit anschließender GABA-

immunocytochemie der retrograd markierten Neurone im Mittelhirn. Viele Forschergruppen sind sich bis heute uneinig darüber, ob die präganglionären Neurone des CG ausschließlich im klassisch definierten EWpg liegen, oder in zusätzlichen Zellgruppen, wie dem anteromedianen Kern (AM), der rostral des EWpg liegt, dem Nucleus von Perlia oder den früher beschriebenen Untergruppen des Edinger-Westphal Kerns: der dorsalen, medialen und lateralen Zellgruppe (Akert et al., 1980a; May et al., 2008b vs. Burde and Williams, 1989). Transsynaptische Tracerstudien am Affen zeigten, dass die „lateral visceral column“ (lvc) des EW, die dorsolateral zum klassisch beschriebenen EW innerhalb des SOA liegt und sich mit der Lokalisation GABAerger Neurone deckt und Eingänge vom Nucleus praetectalis olivaris enthält (Büttner-Ennever et al., 1996; Kourouyan and Horton, 1997). Auffällig ist, dass nur bei den Tracer-studien, bei denen in das CG injiziert worden war, retrograd markierte Neurone im Bereich der lvc gefunden wurden (Burde and Williams, 1989). Studien bei denen in die vordere Augenkammer injiziert worden war, zeigten lediglich eine Markierung im traditionellen EW (Akert et al., 1980a). Die in dieser Studie beobachtete GABAerge Neuronenpopulation im Bereich des lateralen SOA könnte demnach der beschriebenen lvc entsprechen.

#### **4.3 FUNKTION VON GABA IM CG**

Die genaue Funktion von GABA in den Terminalen im Ganglion ciliare bei verschiedenen Spezies ist nach wie vor nicht geklärt und lässt Raum für Spekulationen. Dadurch, dass sich im CG bei Vertebraten zwei funktionelle Neuronensubgruppen (Pupillen- und Akkommodationsneurone) befinden (Martin and Pilar, 1963a; b; Burde, 1967; Marwitt et al., 1971; Hultborn et al., 1978; Reiner et al., 1983; Neuhuber and Schrödl, 2011) und GABAerge Terminalen eine Subpopulation aller CG-Neurone kontaktieren, wurde zu Beginn angenommen, dass GABA entweder beim Vorgang der Pupillenkonstriktion **oder** der Nah-Akkommodation eine Rolle spielt. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden, da keines der durchgeführten Experimente, die einen Hinweis auf die Beteiligung von GABA geben sollten, das erwartete Ergebnis lieferte.



So wurden nach Tracer-Injektionen in die vordere und hinter Augenkammer bei der Ratte, sowie in den M. ciliaris beim Rhesusaffen, sowohl Tracer-markierte, als auch -unmarkierte Neurone von GAD-positiven Terminalen kontaktiert. Durch die Lage des M. sphincter pupillae an der Grenze zwischen vorderer und hinterer Augenkammer, sollte die Tracer-Injektion in die vordere Augenkammer im CG hauptsächlich Pupillenneurone markieren, während die Injektionen in den M. ciliaris bzw. die hintere Augenkammer hauptsächlich Akkommodationsneurone im CG (vermutlich wurden hier sowohl Akkommodations-, als auch einige Pupillenneurone markiert) anzeigen sollten.

Zudem wurden auch beim Vogel (dieser besitzt 3 funktionelle Neuronensubgruppen im CG Reiner et al., 1991) CG-Neurone, die zur Aderhaut projizieren, von GABAergen Terminalen kontaktiert, was ebenso ein Hinweis darauf sein könnte, dass GABA im CG keiner speziellen Funktion bzw. Vorgang zugeordnet werden kann.

In der Untersuchung des Anteils GABA-rezipienter Neurone im CG verschiedener Spezies konnte kein Zusammenhang zu speziellen visuellen Eigenschaften, wie guter Akkommodationsfähigkeit oder Augenstellung, der jeweiligen Spezies erbracht werden. Es konnte aber erstmalig gezeigt werden, dass das Vorkommen von GABA in Endigungen im CG ein allgemeines Merkmal von Vertebraten ist.

Bei pigmentierten Ratten erhielten vergleichsweise mehr CG-Neurone einen GABAergen Eingang, als die CG-Neurone bei Albino-Tieren. Inwieweit der beobachtete geringere Anteil GABA-rezipienter Neurone bei Albino-Tieren mit deren geringeren Akkommodationsfähigkeiten zusammenhängt ist unklar (Prusky et al., 2002).

Dadurch, dass jedes einzelne CG-Neuron sowohl GABA-A, als auch GABA-B Rezeptoren besitzt, erschließt es sich dahingehend als Voraussetzung dafür, dass jedes Neuron in der Lage ist GABA zu binden und auf GABA als inhibitorischen Neurotransmitter zu reagieren. Während GABA-A Rezeptoren ligandengesteuerte Ionenkanäle sind, die dafür bekannt sind GABA schnell zu übertragen, sind GABA-B Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Signaltransduktionswege

modulieren können, je nachdem, ob sie präsynaptisch oder postsynaptisch vorkommen und wirken.

Bis heute wurde die GABAerge Innervation des CG lediglich beim embryonalen Huhn gezeigt und untersucht (McEachern et al., 1985). Mittels pharmakologischer Studien in dissoziierten CG-Neuron Zellkulturen von frisch geschlüpften Küken konnte die Expression von GABA-A Rezeptoren, welche Chlorid-Kanäle aktivieren, nachgewiesen werden (McEachern et al., 1985; McEachern and Berg, 1988). Zudem wurde gezeigt, dass die Amplitude postsynaptischer Potenziale in CG-Neuronen bei Huhnembryos drastisch reduziert war, nachdem GABA auf das isolierte CG gegeben worden war und, dass die Transmission durch das CG nach Stimulation des präganglionären Nervenstumpfes komplett geblockt wurde (McEachern et al., 1985). Ebenfalls beim Huhn konnte demonstriert werden, dass GABA und ACh miteinander interagieren, indem gezeigt wurde, dass die, mit ACh erzielte Aktivierung postsynaptischer, nikotinischer alpha-7 Acetylcholinrezeptoren, die GABA-Antwort verringerte (Zhang and Berg, 2007). Beispiele für diese Co-Transmission von GABA und ACh und die möglichen funktionellen Konsequenzen wurden von Granger und Kollegen neu diskutiert (Granger et al., 2016). Beispielsweise könnte GABA dazu dienen die, durch ACh hervorgerufene Erregung/ Aktivierung einzuschränken, oder zu blocken. Des Weiteren könnte die Ausschüttung des einen Transmitters dazu genutzt werden die darauffolgende Ausschüttung des anderen Transmitters zu modulieren (siehe Shrivastava et al., 2011).

Neuere Arbeiten zum sympathischen und parasympathischen System lassen zum Beispiel vermuten, dass diese beiden Systeme enger miteinander verbunden sind, als bisher angenommen. Zwar wird die Pupillenkonstriktion wohl klassischerweise mittels des Parasympathikus und die Pupillenerweiterung mittels des Sympathikus vermittelt, jedoch sollen beide Einfluss aufeinander nehmen (Szabadi, 2018).

Ohne das Wissen über die genaue Lokalisation der Quelle des GABA/ACh-Eingangs in das CG, sowie die physiologische Aktivität der kontaktierten CG-Neuronpopulation ist es schwierig über eine spezifische Funktion der Co-Transmission im CG zu spekulieren. Allerdings ist diese Organisation kein Einzelfall. Ito et al., haben einen ähnlichen GABA/ACh-Eingang auf postganglionäre Neurone im Ganglion cervicale superius der Ratte entdeckt, deren Quelle eine Untergruppe

von präganglionären Neuronen innerhalb des Nucleus intermediolateralis ist (Ito et al., 2007).

#### **4.4 FAZIT**

Die aktuelle Studie demonstriert zum ersten Mal, dass eine Subpopulation postganglionärer Neurone im CG aller hier untersuchten Wirbeltiere von Afferenzen kontaktiert werden, die ACh und GABA als Co-Transmitter nutzen. Der Eingang auf diese Subpopulation war von Spezies zu Spezies, unabhängig von deren visuellen Fähigkeiten und Augenposition, unterschiedlich stark ausgeprägt, jedoch grundsätzlich immer vorhanden. Der Nachweis von GABA-Rezeptoren an den CG-Neuronen, sowie der Nachweis von GABA in den CG-Terminalen in den EM-Studien zeigen, dass dieser GABAerge Input ins CG funktionell ist. Welche Funktion genau diesen GABAergen Eingängen auf eine Subpopulation postganglionärer CG-Neurone zukommen, wurde versucht anhand verschiedener Untersuchungen zu klären. Insgesamt deuten die Ergebnisse aus den durchgeführten retrograden Tract-tracing Injektionen in die vordere und hintere Augenkammer bei der Ratte, sowie die Injektion in den M. ciliaris beim Affen und die immunhistochemische Markierung des Tauben-CG Kompletpräparats darauf hin, dass die GABAergen Endigungen nicht auf eine einzelne funktionelle CG-Subpopulation beschränkt sind, sondern eine eher allgemein modulatorische Rolle bei allen Populationen erfüllen. Indizien dafür sind z.B. die GABAergen Endigungen an Choroidneuronen, sowie Ciliarneuronen beim Vogel (vgl. Reiner et al., 1991; McDougal and Gamlin, 2015), oder das Vorkommen von GABA-B Rezeptoren, die tendenziell für eine langsame, modulatorische Funktion sprechen. Zudem konnte keine Relation zwischen der Menge des GABAergen Inputs ins CG und den visuellen Fähigkeiten (z.B. keine/kaum Akkommodationsfähigkeit, d.h. vermutlich wenige Akkommodations- und viele Pupillenneurone im CG) bei den verschiedenen Vertebraten festgestellt werden (vgl. Warwick, 1954). Damit wird eine alleinige Beteiligung von GABA an der Pupillenkonstriktion ausgeschlossen, eine Beteiligung an sowohl Pupillenkonstriktion, als auch Nah-Akkommodation und Steuerung des Blutflusses in der Aderhaut scheint jedoch wahrscheinlich.

Die aktuelle Studie zeigt zudem erstmalig, dass die Quelle des GABAergen Eingangs in das CG im Mittelhirn im Bereich des supraoculomotorischen Areals lokalisiert ist. Ob diese präganglionäre GABA/ACh Neuronenpopulation innerhalb der topografischen Grenzen des bekannten präganglionären Edinger-Westphal Kerns liegt, oder weiter lateral im SOA bleibt zu klären.

Letztendlich zeigt diese Arbeit ein weiteres System, bei dem das Dale`s Prinzip des Ein-Neuron-Ein-Transmitter-Systems nicht zutrifft. Zudem scheint das Ganglion ciliare nicht, wie in der Vergangenheit angenommen, eine reine Relaisstation zu sein, sondern ein Ort mit modulierender, integrativer Bedeutung. Weitere Versuche sind notwendig, um die exakte Funktion von GABA im CG und damit die Beteiligung an den, vom CG vermittelten Vorgängen zu untersuchen und die Lage der präganglionären GABA/ChAT-Neuronenpopulation im Bereich des SOA genau zu lokalisieren.

## LITERATUR

- Akert K, Glicksman MA, Lang W, Grob P, Huber A. 1980b. The Edinger-Westphal nucleus in the monkey. A retrograde tracer study. *Brain Res* 184:491-498.
- Alexander G, Shillito EE. 1977. The importance of odour, appearance and voice in maternal recognition of the young in Merino sheep (*Ovis aries*). *App Anim Eth* 3:127-135.
- Angelucci A, Clasca F, Sur M. 1996. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Meth* 65(1):101-112.
- Appell PP, Behan M. 1990. Sources of subcortical GABAergic projections to the superior colliculus in the cat. *J Comparative Neurol* 302:143-158.
- Artal P, De Tejada PH, Tedo CM, Green DG. 1998. Retinal image quality in the rodent eye. *Vis Neurosci* 15:597-605.
- Banks MS, Sprague WW, Schmoll J, Parnell JA, Love GD. 2015. Why do animal eyes have pupils of different shapes? *Sci Adv* 1(7):e1500391.
- Barner-soi M, May PJ, Horn AK. 2017. GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys - A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 525(7):1517-1531.
- Barner-soi M, May PJ. 2016. Postembedding Immunohistochemistry for Inhibitory Neurotransmitters in Conjunction with Neuroanatomical Tracers. In: Van Bockstaele EJ, ed. *Transmission Electron Microscopy Methods for Understanding the Brain*. New York, NY: Springer New York. p 181-203.
- Baumeister M, Kohnen T. 2008. Akkommodation und Presbyopie, Teil 1: Physiologie der Akkommodation und Entwicklung der Presbyopie. *Der Ophthalmologe* 105(6):597-610.
- Beaulieu C, Somogyi P. 1991. Enrichment of cholinergic synaptic terminals on GABAergic neurons and coexistence of immunoreactive GABA and choline acetyltransferase in the same synaptic terminals in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol* 304(4):666-680.
- Brandt HM, Apkarian AV. 1992. Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. *J Neurosci Meth* 45:35-40.
- Burde RM. 1967. The pupil. *Int Ophth Clin* 7(4):839-855.
- Burde RM, Williams F. 1989. Parasympathetic nuclei. *Brain Res* 498:371-375.
- Burnstock G. 1976. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62(2):491-503.

- Büttner-Ennever JA, Cohen B, Horn AKE, Reisine H. 1996. Pretectal projections to the oculomotor complex of the monkey and their role in eye movements. *J Comp Neurol* 366:348-359.
- Büttner-Ennever JA, Horn AKE, Scherberger H, D'Ascanio P. 2001. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. *J Comp Neurol* 438:318-335.
- Caffe AR, Hawkins RK, De Zeeuw CI. 1996. Coexistence of choline acetyltransferase and GABA in axon terminals in the dorsal cap of the rat inferior olive. *Brain Res* 724(1):136-140.
- Campbell FW, Gubisch RW. 1966. Optical performance of the human eye. *J Physiol* 186:558-578.
- David M B. 2003. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Tr Neurosci* 26(6):314-320.
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. 1992. A novel neuronal messenger molecule in the brain: the free radical nitric oxide. *Ann neurol* 32:297-311.
- Duarte CB, Santos PF, Carvalho AP. 1999. Corelease of two functionally opposite neurotransmitters by retinal amacrine cells: experimental evidence and functional significance. *J Neurosci Res* 58(4):475-479.
- Eccles JC, Fatt P, Koketsu K. 1954. Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J Physiol* 126(3):524-562.
- Edinger L. 1885. Über den Verlauf der centralen Hirnnervenbahnen mit Demonstrationen von Präparaten. *Arch Psychiatr Nervenkrankheiten*. 16:858–859.
- Ehinger B, Falck B. 1970. Uptake of some catecholamines and their precursors into neurons of the rat ciliary ganglion. *Acta Physiol Scand* 78(1):132-141.
- Erichsen JT, Karten HJ, Eldred WD, Brecha NC. 1982a. Localization of substance p-like and enkephalin-like immunoreactivity within preganglionic terminals of the avian ciliary ganglion: light and electron microscopy. *J Neurosci* 2:994-1003.
- Erichsen JT, May PJ. 2002. The pupillary and ciliary components of the cat Edinger-Westphal nucleus: A transsynaptic transport investigation. *Vis Neurosci* 19:15-29.
- Erichsen JT, Reiner A, Karten HJ. 1982b. Co-occurrence of substance P-like and Leu-enkephalin-like immunoreactivities in neurones and fibres of avian nervous system. *Nature* 295:407-410.
- Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7(1):91-100.

- Flügel-Koch C, Neuhuber WL, Kaufman PL, Lutjen-Drecoll E. 2009. Morphologic indication for proprioception in the human ciliary muscle. *Invest Ophth Vis Sci* 50(12):5529-5536.
- Foster RG. 2005. Neurobiology: bright blue times. *Nature* 433(7027):698-699.
- Gamlin PD, Reiner A. 1991. The Edinger-Westphal nucleus: sources of input influencing accommodation, pupilloconstriction, and choroidal blood flow. *J Comp Neurol* 306(3):425-438.
- Gamlin PD, Reiner A, Erichsen JT, Karten HJ, Cohen DH. 1984. The neural substrate for the pupillary light reflex in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 226(4):523-543.
- Granger AJ, Mulder N, Saunders A, Sabatini BL. 2016. Cotransmission of acetylcholine and GABA. *Neuropharmacol* 100:40-46.
- Gray EG. 1969. Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review. *Prog Brain Res* 31:141-155.
- Grimes P, Von Sallmann L. 1960. Comparative anatomy of the ciliary nerves. *Arch Ophthalmol* 64:81-91.
- Grimes PA, Koeberlein B, Tigges M, Stone RA. 1998. Neuropeptide Y-like immunoreactivity localizes to preganglionic axon terminals in the rhesus monkey ciliary ganglion. *Inv Ophth Vis Sci* 39(2):227-232.
- Gundersen V. 2008. Co-localization of excitatory and inhibitory transmitters in the brain. *Acta Neurol Scand Suppl* 188:29-33.
- Hamel O, Corre P, Ploteau S, Armstrong O, Rogez JM, Robert R, Hamel A. 2012. Ciliary ganglion afferents and efferents variations: a possible explanation of postganglionic mydriasis. *Surg Radiol Anat* 34(10):897-902.
- Hanani M. 2010. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. *Brain Res Rev* 64(2):304-327.
- Harris KM, Weinberg RJ. 2012. Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(5):a005587.
- Hayasaki H, Sohma Y, Kanbara K, Maemura K, Kubota T, Watanabe M. 2006. A local GABAergic system within rat trigeminal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 23(3):745-757.
- Hayasaki H, Sohma Y, Kanbara K, Otsuki Y. 2012. Heterogenous GABA(B) receptor-mediated pathways are involved in the local GABAergic system of the rat trigeminal ganglion: possible involvement of KCTD proteins. *Neuroscience* 218:344-358.
- Hess A. 1965. Developmental changes in the structure of the synapse on the myelinated cell bodies of the chicken ciliary ganglion. *J Cell Biol* 25:1-19.

- Hittinger M, Horn AK. 2012. The anatomical identification of saccadic omnipause neurons in the rat brainstem. *Neurosci* 210:191-199.
- Hnasko TS, Edwards RH. 2012. Neurotransmitter Co-release: Mechanism and Physiological Role. *Ann Rev Physiol* 74:225-243.
- Horn AK, Eberhorn A, Härtig W, Ardelenanu P, Messoudi A, Büttner-Ennever JA. 2008. Periocular motor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol* 507(3):1317-1335.
- Horn AK, Schulze C, Radtke-Schuller S. 2009. The Edinger-Westphal nucleus represents different functional cell groups in different species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1164:45-50.
- Hultborn H, Mori K, Tsukahara N. 1978. The neuronal pathway subserving the pupillary light reflex. *Brain Res* 159(2):255-267.
- Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. 2007. Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *J Comp Neurol* 502(1):113-125.
- Iwasaki M, Inomata H. 1986. Relation Between Superficial Capillaries and Foveal Structures in the Human Retina. *Invest Ophth Vis Sci* 27:1698-1705.
- Jackson PC. 1986. Innervation of the iris by individual parasympathetic axons in the adult mouse. *J Physiol* 378:485-495.
- Jan YN, Jan LY, Kuffler SW. 1979. A peptide as a possible transmitter in sympathetic ganglia of the frog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3):1501-1505.
- Jia H-G, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. 2003. Colocalization of  $\gamma$ -aminobutyric acid and acetylcholine in neurons in the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei in the cat: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 992(2):205-219.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J. 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281(5375):419-424.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. 2013. Principles of neural science. McGraw-Hill Companies 5.:1030- 1032.
- Kardon RH. 2005. Anatomy and physiology of the autonomic nervous system. In: Miller, N. R., Newman, N. J., Biouesse, V., & Kerrison, J. B. (Eds.), Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology, 6th ed., 649–714.
- Kendrick K. 1990. Through a sheep's eye. *New Scientist* (United Kingdom).
- Kirch W, Neuhuber W, Tamm E. 1995. Immunohistochemical localization of neuropeptides in the human ciliary ganglion. *Brain Res* 681:229-234.



- Kourouyan HD, Horton JC. 1997. Transneuronal retinal input to the primate Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol* 381:68-80.
- Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PDR, Palkovits M, Horn AKE, Toledo CAB, Ryabinin AE. 2011. The Edinger-Westphal nucleus: A historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol* 519(8):1413-1434.
- Kuder T, Kuchinka J, Nowak E, Szczurkowski A, Radzimirska M. 2003. A comparative study on the morphology and topography of the ciliary ganglion in midday gerbil (*Meriones meridianus*) and turtle (*Agrionemys horsfieldii*). *Anat Anz* (185):351- 357.
- Land M. 2015. Eye movements of vertebrates and their relation to eye form and function. *J Comp Physiol A* 201(2):195-214.
- Landis SC, Jackson PC, Fredieu JR, Thibault J. 1987. Catecholaminergic properties of cholinergic neurons and synapses in adult rat ciliary ganglion. *J Neurosci* 7(11):3574-3587.
- Landmesser L, Pilar G. 1970. Selective reinnervation of two cell populations in the adult pigeon ciliary ganglion. *J Physiol* 211(1):203-216.
- Landmesser L, Pilar G. 1972. The onset and development of transmission in the chick ciliary ganglion. *J Physiol* 222:691-713.
- Landmesser L, Pilar G. 1974. Synaptic transmission and cell death during normal ganglionic development. *J Physiol* 241(3):737-749.
- Laurens H. 1923. Studies on the relative physiological value of spectral lights.III: the pupillomotor effects of wavelenghts of equal energy content. *J Physiol* 64:97-119.
- Lazarov NE. 2002. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 66:19-59.
- Lee S, Kim K, Zhou ZJ. 2010. Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron* 68(6):1159-1172.
- Lenhossek MV. 1910. Über die physiologische Bedeutung der Neurofibrillen. *Anat Anz* 36:257-281.
- Lienbacher K, Mustari M, Ying HS, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2011. Do Palisade Endings in Extraocular Muscles Arise from Neurons in the Motor Nuclei? *Invest Ophth Vis Sci* 52(5):2510-2519.
- Liu Z, Neff RA, Berg DK. 2006. Sequential Interplay of Nicotinic and GABAergic Signaling Guides Neuronal Development. *Science* 314(5805):1610-1613.

- Lovasova K, Sulla IJ, Bolekova A, Sulla I, Kluchova D. 2013. Anatomical study of the roots of cranial parasympathetic ganglia: a contribution to medical education. *Ann Anat* 195(3):205-211.
- Lowenstein O, Feinberg R, Loewenfeld I. 1963. Pupillary movements during acute and chronic fatigue. *Invest Ophth Vis Sci* 2.
- Lütjen-Drecoll E. 2006. Choroidal innervation in primate eyes. *Exp Eye Res* 82:357-361.
- Lyman D, Mugnaini E. 1980. The avian accessory oculomotor nucleus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 6: 479.
- Martin AR, Pilar G. 1963a. Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion. *J Physiol* 168:443-463.
- Martin AR, Pilar G. 1963b. Transmission through the ciliary ganglion of the chick. *J Physiol* 168:464-475.
- Marwitt R, Pilar G, Weakly JN. 1971. Characterization of two ganglion cell populations in avian ciliary ganglion. *Brain Res* 25:317-334.
- May PJ, Reiner AJ, Ryabinin AE. 2008a. Comparison of the distributions of Urocortin-containing and cholinergic neurons in the perioculomotor midbrain of the cat and Macaque. *J Comp Neurol* 507:1300-1316.
- May PJ, Sun W, Erichsen JT. 2008b. Defining the pupillary component of the perioculomotor preganglionic population within a unitary primate Edinger-Westphal nucleus. In: Kennard C, Leigh JR, eds. Amsterdam: Elsevier. p 97-106.
- May PJ, Warren S. 1993. Ultrastructure of the macaque ciliary ganglion. *J Neurocytol* 22:1073-1095.
- May PJ, Warren S, Bohlen MO, Barnerssoi M, Horn AKE. 2016. A central mesencephalic reticular formation projection to the Edinger–Westphal nuclei. *Brain Struct Funct* 221(8):4073-4089.
- McDougal D, Gamlin PD. 2015. Autonomic control of the eye. *Comp Physiol* 5.
- McEachern AE, Berg DK. 1988. Benzodiazepine interactions with GABAA receptors on chick ciliary ganglion neurons. *Mol pharmacol* 34(2):129-135.
- McEachern AE, Jacob MH, Berg DK. 1989. Differential effects of nerve transection on the ACh and GABA receptors of chick ciliary ganglion neurons. *J neurosci* 9(11):3899-3907.
- McEachern AE, Margiotta JF, Berg DK. 1985. gamma-Aminobutyric acid receptors on chick ciliary ganglion neurons in vivo and in cell culture. *J Neurosci* 5:2690-2695.

- Murphy SM, Pilowsky PM, Llewellyn-Smith IJ. 1998. Pre-embedding staining for GAD67 versus postembedding staining for GABA as markers for central GABAergic terminals. *J Histochem Cytochem* 46(11):1261-1268.
- Narayanan CH, Narayanan Y. 1976. An experimental inquiry into the central source of preganglionic fibers to the chick ciliary ganglion. *J Comp Neurol* 166(1):101-109.
- Nemec P, Cveková P, Benada O, Wielkopolska E, Olkowicz S, Turlejski K, Bura H, Bennett NC, Peichl L. 2008. The visual system in subterranean African mole-rats (Rodentia, Bathyergidae): Retina, subcortical visual nuclei and primary visual cortex. *Brain Res Bul* 75:356-364.
- Neuhuber W, Schrödl F. 2011. Autonomic control of the eye and the iris. *Autonomic neuroscience: basic and clinical* (165):67-69.
- Perea G, Araque A. 2010. Glia modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* 63(1-2):93-102.
- Perez G, Keyeser R. 1986. Cell body counts in the human ciliary ganglion. *Invest Ophth Vis Sci* 27:1428- 1431.
- Piggins D, Phillips JC. 1966. The eye of the domesticated sheep with implications for vision. *Anim Sci* 62:301-308.
- Pilar G, Johnson D. 1988. Model cholinergic systems: the avian ciliary ganglion. *The Cholinergic Synapse*: Springer. p 41-54.
- Pilar G, Landmesser L, Burstein L. 1980. Competition for survival among developing ciliary ganglion cells. *J Neurophysiol* 43(1):233-254.
- Privitera C, Renninger L, Carney T, Klein S, Aguilar M. 2008. The pupil dilation response to visual detection. *SPIE- IS&T* 6806.
- Prusky GT, Harker KT, Douglas RM, Whishaw IQ. 2002. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behav Brain Res* 136(2):339-348.
- Reger JF. 1966. The fine structure of iridial constrictor pupillae muscle of Alligator mississippiensis. *Anat Rec* 155:197-215.
- Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. 1986. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J* 5:535-541.
- Reiner A. 1987. A VIP-like peptide co-occurs with substance P and enkephalin in cholinergic preganglionic terminals of the avian ciliary ganglion. *Neurosci Lett* 78:22-28.

- Reiner A, Erichsen JT, Cabot JB, Evinger C, Fitzgerald ME, Karten HJ. 1991. Neurotransmitter organization of the nucleus of Edinger-Westphal and its projection to the avian ciliary ganglion. *Vis Neurosci* 6:451-472.
- Reiner A, Karten HJ, Gamlin PDR, Erichsen JT. 1983. Parasympathetic ocular control. *Trends Neurosci* 6:140-145.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Meth* 103:23-37.
- Root DH, Mejias-Aponte CA, Zhang S, Wang HL, Hoffman AF, Lupica CR, Morales M. 2014. Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci* 17(11):1543-1551.
- Ruskell GL. 1971. The distribution of autonomic post-ganglionic nerve fibres to the lacrimal gland in monkeys. *J Anat* 109(Pt 2):229-242.
- Ruskell GL, Griffiths T. 1979. Peripheral nerve pathway to the ciliary muscle. *Exp Eye Res* 28(3):277-284.
- Saunders A, Granger AJ, Sabatini BL. 2015. Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *Elife* 4.
- Schrödl F, Kaser- Eichberger A, Trost A, Strohmaier C, Bogner B, Runge C, Bruckner D, Krefft K, Kofler B, Brandtner H, Reitsamer HA. 2015. Alarin in cranial autonomic ganglia of human and rat. *Exp Brain Res* 131:63-68.
- Sethuramanujam S, McLaughlin AJ, deRosenroll G, Hoggarth A, Schwab DJ, Awatramani GB. 2016. A Central Role for Mixed Acetylcholine/GABA Transmission in Direction Coding in the Retina. *Neuron*.
- Shabel SJ, Proulx CD, Piriz J, Malinow R. 2014. Mood regulation. GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment. *Science* 345(6203):1494-1498.
- Shrivastava AN, Triller A, Sieghart W. 2011. GABA(A) Receptors: Post-Synaptic Co-Localization and Cross-Talk with Other Receptors. *Front Cell Neurosci* 5:7.
- Siessere S, Vitti M, Sousa LG, Semprini M, Iyomasa MM, Regalo SC. 2008. Anatomic variation of cranial parasympathetic ganglia. *Braz oral res* 22(2):101-105.
- Sinnreich Z, Nathan H. 1981. The ciliary ganglion in man (anatomical observation). *Anat Anz* 150:287-297.
- Sorimachi M, Rhee JS, Shimura M, Akaike N. 1997. Mechanisms of GABA- and glycine-induced increases of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentrations in chick embryo ciliary ganglion cells. *J Neuroch* 69(2):797-805.
- Stone C, Pinto LH. 1993. Response properties of ganglion cells in the isolated mouse retina. *Vis Neurosci* 10:31-39.

- Stoyanova I, Dandov A, Lazarov N, Chouchkov C. 1998. GABA- and glutamate-immunoreactivity in sensory ganglia of cat: a quantitative analysis. *Arch Physiol Biochem* 106(5):362-369.
- Strassman A, Mason P, Eckenstein F, Baughman RW, Maciewicz R. 1987. Choline acetyltransferase immunocytochemistry of Edinger-Westphal and ciliary ganglion afferent neurons in the cat. *Brain Res* 423(1-2):293-304.
- Sun W, May PJ. 2014a. Central pupillary light reflex circuits in the cat: I. The olivary pretectal nucleus. *J comp Neurol*.
- Sun W, May PJ. 2014b. Central pupillary light reflex circuits in the cat: II. Morphology, ultrastructure, and inputs of preganglionic motoneurons. *J comp Neurol*.
- Sun WS, May PJ. 1993. Organization of the extraocular and preganglionic motoneurons supplying the orbit in the lesser galago. *Anat Rec* 237:89-103.
- Szabadi E. 2018. Functional Organization of the Sympathetic Pathways Controlling the Pupil: Light-Inhibited and Light-Stimulated Pathways. *Front Neurol* 9:1069.
- Tanida H, Senda K, Suzuki S, Tanaka T, Yoshimoto T. 1991. Color discrimination in weanling pigs. *Anim Sci Technol* 62:1029-1034.
- Torrealla F, Carrasco MA. 2004. A review on electron microscopy and neurotransmitter systems. *Brain Res Rev* 47(1-3):5-17.
- Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL. 2012. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490(7419):262-266.
- Tritsch NX, Oh WJ, Gu C, Sabatini BL. 2014. Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. *Elife* 3:e01936.
- Tsen G, Williams B, Allaire P, Zhou YD, Ikonomov O, Kondova I, Jacob MH. 2000. Receptors with opposing functions are in postsynaptic microdomains under one presynaptic terminal. *Nat Neurosci* 3(2):126-132.
- Tuttle JB, Vaca K, Pilar G. 1983. Target influences on ACh synthesis and release by ciliary ganglion neurons in vitro. *Dev Biol* 97(2):255-263.
- Vaaga CE, Borisovska M, Westbrook GL. 2014. Dual-transmitter neurons: Functional implications of co-release and co-transmission. *Curr Opin Neurobiol* 0:25-32.
- Vasconcelos LA, Donaldson C, Sita LV, Casatti CA, Lotfi CF, Wang L, Cadinouche MZ, Frigo L, Elias CF, Lovejoy DA, Bittencourt JC. 2003. Urocortin in the central nervous system of a primate (*Cebus apella*): sequencing, immunohistochemical, and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 463(2):157-175.

- Wang N, Perkins E, Zhou L, Warren S, May PJ. 2013. Anatomical Evidence that the Superior Colliculus Controls Saccades through Central Mesencephalic Reticular Formation Gating of Omnipause Neuron Activity. *J Neurosci* 33(41):16285-16296.
- Wang N, Warren S, May P. 2010. The macaque midbrain reticular formation sends side-specific feedback to the superior colliculus. *Exp Brain Res* 201(4):701-717.
- Warwick B. 1954. The ocular parasympathetic nerve supply and its mesencephalic sources. *J Anat* 88:71-93.
- Watanabe H. 1972. The fine structure of the ciliary ganglion of the guinea pig. *Arch Histol Jap* 34:261-276.
- Westphal CFO. 1887. Ueber einen Fall von chronischer progressiver Lähmung der Augenmuskeln (Ophthalmoplegia externa) nebst Beschreibung von Ganglienzellengruppen im Bereiche des Oculomotoriuskerns. *Arch Psychiat Nervenkrankheiten*.18:846–871.
- Whitteridge D. 1978. Development of the visual system in the sheep. *Arch Ital Biol*.
- Wiedenmann B, Franke WW. 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of presynaptic vesicles *Cell* 41:1017-1028.
- Wolff JR, Joo F, Kasa P, Storm-Mathiesen J, Toldi J, Balcar VJ. 1986. Presence of neurons with GABA-like immunoreactivity in the superior cervical ganglion of the rat. *Neurosci Lett* 71(2):157-162.
- Zehe C, Mustari MJ, Hess BJ, Horn AK. 2015. Transmitter inputs to different motoneuron subgroups in the oculomotor and trochlear nucleus in monkey. *Front Neuroanat* 9:95.
- Zhang J, Berg DK. 2007. Reversible inhibition of GABAA receptors by alpha7-containing nicotinic receptors on the vertebrate postsynaptic neurons. *J Physiol* 579(Pt 3):753-763.
- Zhang Y, Hoffmann KP. 1993. Retinal projections to the pretectum, accessory optic system and superior colliculus in pigmented and albino ferrets. *Eur J Neurosci* 5:486-500.
- Zhang YL, Tan CK, Wong WC. 1993. The ciliary ganglion of the cat: a light and electron microscopy study. *Anat Embryol* 187:591-599.
- Zhang YL, Tan CK, Wong WC. 1994a. The ciliary ganglion of the monkey: a light and electron microscope study. *J Anat* 184 ( Pt 2):251-260.
- Zhang YL, Tan CK, Wong WC. 1994b. Localisation of substance P-like immunoreactivity in the ciliary ganglia of monkey (*Macaca fascicularis*) and cat: a light- and electron-microscopic study. *Cell Tis Res* 276(1):163-171.

Zhou ZJ, Lee S. 2008. Synaptic physiology of direction selectivity in the retina. *J Physiol* 586(18):4371-4376.

---



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1.</b> Innervation der Orbita. ....	2
<b>Abbildung 2.</b> Die innere Augenmuskulatur dargestellt am menschlichen Auge und ihre Verbindung über das Ganglion ciliare (CG) zum Edinger-Westphal Kern (EW)..	4
<b>Abbildung 3.</b> Lage von Iris, inneren Augenmuskeln (M. ciliaris, M. sphincter pupillae, M. dilatator pupillae), sowie Vorder- und Hinterkammer.....	6
<b>Abbildung 4.</b> Parasympathische und sympathische Innervation der Iris bei Primaten. ....	10
<b>Abbildung 5.</b> Übersicht über die beteiligten Neuronengruppen und Faserbahnen bei Nah-Akkommodation und Pupillenkonstriktion. ....	12
<b>Abbildung 6.</b> Organisation von EWpg und EWcp bei verschiedenen ausgewählten Spezies: Vogel (avian), Ratte (rat), Katze (cat), Affe (monkey) und Mensch (human). ....	15
<b>Abbildung 7.</b> Schematische Darstellung der zwei morphologisch unterschiedlichen Terminaltypen präganglionärer Endigungen und ihrer Zielneurone im Ganglion ciliare beim Vogel.....	17
<b>Abbildung 8.</b> Darstellung der Fasertypen, die durch das Ganglion ciliare ziehen. ..	18
<b>Abbildung 9.</b> Immunperoxidase-Färbung eines Affen-CG Gefrierschnittes. ....	21
<b>Abbildung 10.</b> Augenposition und visuelle/optische Eigenschaften der untersuchten Spezies.....	22
<b>Abbildung 11.</b> Ganglion ciliare eines Rhesusaffen.....	33
<b>Abbildung 12.</b> Schema einer Tract-Tracer-Injektion in die vordere (1) bzw. hintere (2) Augenkammer mit retrogradem Transport. ....	38
<b>Abbildung 13.</b> Injektionstellen der 8 kleinen WGA-Injektionen (10% und 1%) in den M. ciliaris eines Affen (Macaca nemestrina). ....	40
<b>Abbildung 14 A-C.</b> Konfokalbilder eines Affen-CG Immunfluoreszenz-markiert auf GAD und Synaptophysin (Syn).....	53
<b>Abbildung 15 A-F.</b> Konfokalbilder einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung eines Affen-CG.....	54
<b>Abbildung 16.</b> Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen drei unterschiedliche Terminaltypen, die Dendriten (Den) oder Dornen („spines“ (Sp)) im perisomatischen Neuropil kontaktieren.....	56
<b>Abbildung 17.</b> Ultrastruktur von Neuronen mit At <sub>1</sub> -Eingängen. ....	58
<b>Abbildung 18.</b> Ultrastruktur von CG-Neuronen, welche von GABA-Immunogold-markierten At <sub>2</sub> Terminalen kontaktiert werden.....	60
<b>Abbildung 19.</b> Ultrastrukturelle Details GABA-positiver Terminalen.....	62
<b>Abbildung 20.</b> Konfokalbilder von CG-Gefrierschnitten eines Affen, markiert mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung auf GAD und GABA-A Rezeptor (GABA-A, E-H) oder GAD und GABA-B Rezeptor 1 (GABA-B R1, A-D).....	65
<b>Abbildung 21.</b> Konfokalbilder eines CG-Gefrierschnittes einer Ratte nach einer CTB-Injektion in die vordere linke Augenkammer immunhistochemisch gefärbt auf CTB (A, rot) und GAD (B, grün).....	67

<b>Abbildung 22.</b> Konfokalbild eines CG-Gefrierschnittes einer Ratte nach einer WGA-Injektion in die hintere linke Augenkammer, immunhistochemisch gefärbt auf WGA (rot) und GAD (grün).....	69
<b>Abbildung 23.</b> Doppelimmunhistochemische Färbung eines Affen CG Gefrierschnittes (M. nemestrina) auf WGA (braun) und GAD (schwarz) nach Tract-tracer Injektion mit WGA in den rechten M. ciliaris. ....	71
<b>Abbildung 24.</b> ChAT- (A+E, grün) und GAD- (B+F, rot) Färbung von CG-Schnitten einer pigmentierten Ratte (A-D) und einer Albino Ratte (E-H). ....	74
<b>Abbildung 25.</b> Die Abbildung zeigt die Auswertung der einzelnen Wildtyp- (WT) und Albinofälle (Al). ....	74
<b>Abbildung 26.</b> Konfokalbilder eines Kompletpräparats (Wholemout) eines Tauben-CG, immunhistochemisch markiert auf ChAT (grün) und GAD (rot). ....	76
<b>Abbildung 27.</b> Konfokalbilder von CG-Schnitten verschiedener Wirbeltierspezies immunhistochemisch gefärbt auf GAD (rot) und ChAT oder Syn (grün). ....	79
<b>Abbildung 28.</b> Rekonstruktion der Tracer-Injektionsstellen. ....	82
<b>Abbildung 29.</b> Fluoreszenzfärbung auf BDA und GAD im CG eines Rhesusaffen..	84
<b>Abbildung 30.</b> Fluoreszenzfärbung auf CTB (A) und GAD (B) im CG eines Rhesusaffen. ....	86
<b>Abbildung 31.</b> Schematische Übersicht der durchgeführten Tracer-Injektionen. ....	87
<b>Abbildung 32.</b> Plot benachbarter Mittelhirnschnitte eines Affen immunhistochemisch gefärbt auf GAD oder ChAT. ....	89
<b>Abbildung 33.</b> Schema der möglichen Organisation der Quelle des Eingangs ins CG. ....	101

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
Aq	Aquädukt
BDA	Biotindextran-Amine
CG	Ganglion ciliare
ChAT	Cholinacetyltransferase
CGRP	Calcitonin Gene-related Peptide
cMRF	central mesencephalic reticular formation
CTB	Choleratoxin Untereinheit B
DAB	Diaminobenzidin
EM	Elektronenmikroskopie
EWpg	Edinger-Westphal Kern (präganglionär)
EWcp	Edinger-Westphal Kern („centrally projecting“)
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
IO	Musculus obliquus inferior
IR	Musculus rectus inferior
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LM	Lichtmikroskopie
LP	Musculus levator palpebrae
LR	Musculus rectus lateralis
Ivc	lateral visceral column
M	Musculus
N	Nervus
NCB	Nervi ciliares breves

NIII	Nervus oculomotorius
NII	Nervus opticus
nIII	Nucleus oculomotorius
NV	Nervus trigeminus
PLR	Pupillen-Lichtreflex
PNR	Pupillen-Nah-Antwort
SCG	Ganglion cervicale superius
SO	Musculus obliquus superior
SP	Substanz P
SR	Musculus rectus superior
WGA	Weizenkeimagglutinin

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1.</b> Liste der verwendeten Antikörper und ihrer Quellen mit angewendeten Methoden.....	49
<b>Tabelle 2.</b> Prozentsatz der CG-Neurone, die einen GABAergen Eingang erhalten bei verschiedenen Wirbeltier-Spezies. ....	80
<b>Tabelle 3.</b> Übersicht über die vermuteten Terminalentypen im Affen-CG. ....	95

## VERÖFFENTLICHTE PUBLIKATIONEN

Lienbacher Karoline, Sänger Kathrin, Strassburger Sebastian, Ehrt Oliver, Rudolph Günther, **Barnerssoi Miriam**, Horn Anja K.E. Extraocular muscles involved in convergence are innervated by an additional set of palisade endings that may differ in their excitability: a human study. Prog Brain Res 248 (im Druck).

**Barnerssoi Miriam**, May PJ, Horn AK. 2017. GABAergic innervation of the ciliary ganglion in macaque monkeys - A light and electron microscopic study. J Comp Neurol 525(7):1517-1531.\*

May PJ, Warren S, Bohlen MO, **Barnerssoi Miriam**, Horn AK. 2016. A central mesencephalic reticular formation projection to the Edinger-Westphal nuclei. Brain Struct Funct 221(8):4073-4089.

**Barnerssoi Miriam** and Paul J. May. (2016) Postembedding Immunohistochemistry for Inhibitory Neurotransmitters in Conjunction with Neuroanatomical Tracers. In: Transmission Electron Microscopy Methods for Understanding the Brain, edited by E.J. Van Bockstaele, Neuromethods 115:181-203 Springer Science, NY.

Teile dieser Doktorarbeit wurden in den mit \* gekennzeichneten Publikationen veroffentlicht.

## VERÖFFENTLICHTE KONGRESSBEITRÄGE

**Miriam Barnerssoi**, Inca Schneider, Jonathan Erichsen, Paul J. May and Anja K.E. Horn (2016) GABAergic innervation of the ciliary ganglion in vertebrates with different visual capabilities and eye position. 8th European Conference on Comparative Neurobiology (ECCN 8), Munich.

**Miriam Barnerssoi**, Paul J. May, Anja K.E. Horn (2015) An electron microscopic study of the monkey ciliary ganglion with emphasis on the GABAergic afferents. 31. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg.

**Miriam Barnerssoi** und Anja K.E. Horn (2015) Evidence for the functionality of GABA within the rat and monkey ciliary ganglion. Eye movements Gordon Research Conference, Bentley University, Waltham.

**Miriam Barnerssoi**, Paul J. May, Anja K.E. Horn (2014) GABAergic innervation of the monkey ciliary ganglion – an electron microscopic study. Neuroscience Conference (SfN), Washington DC.

**Miriam Barnerssoi** und Anja K.E. Horn (2013) GABAergic innervation of the ciliary ganglion in pigmented and albino rats. 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen.

**Miriam Barnerssoi**, Ahmed Messoudi und Anja K.E. Horn (2013) Innervation of the ciliary ganglion in rats. 30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg.

**Miriam Barnerssoi**, Karoline Lienbacher, Christina Zeeh, Jonathan T. Erichsen, Mike Mustari, Paul J. May, Ulrich Büttner, Anja K.E. Horn (2011) GABAergic innervation of the ciliary ganglion. Neuroscience Conference (SfN), Washington DC.

**Miriam Barnerssoi**, Karoline Lienbacher, Christina Zeeh, Paul J. May, Mike Mustari, Anja K.E. Horn (2011) GABAergic innervation of the ciliary ganglion in monkey. 28. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg.





## ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Die GABAerge Innervation des Ganglion ciliare bei verschiedenen Wirbeltierspezies“ selbständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch teilweise bei einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

I hereby confirm that the dissertation „Die GABAerge innervation des Ganglion ciliare bei verschiedenen Wirbeltierspezies“ is the result of my own work and that I have only used sources or materials listed and specified in the dissertation.

München, den 18. April 2019

Miriam Barnerßoi



## ERKLÄRUNG ZUM AUTORENBEITRAG

Beiträge von Miriam Barnerßoi

- Planung aller Experimente
- Durchführung aller Experimente
- Analyse aller Daten
- Design und Zusammenstellung aller Abbildungen
- Schreiben des Manuskripts

München, den 18. April 2019

Miriam Barnerßoi

Prof. Anja Horn-Bochtler